

Aus dem Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. U. Wagner

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg



**Effekte von Flavopiridol, Bortezomib und MG-115 in Kombination mit
Carboplatin auf Ovarialkarzinom-Zelllinien in vitro**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Julia Kranz, geb. Hergarten
aus Simmerath
Marburg 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am
08. Dezember 2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Herr Prof. Dr. H. Schäfer
Referent:	Herr Prof. Dr. U. Wagner
Korreferent:	Frau PD Dr. S. Müller-Brüsselbach

Meinen Eltern

INHALT

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Ovarialkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie, Pathogenese und Pathologie.....	1
1.1.2	Diagnose und Stadieneinteilung.....	1
1.1.3	Ätiologie und Risikofaktoren	2
1.1.4	Therapie und klinische Prognose	2
1.1.5	Neue Therapieansätze	3
1.2	Carboplatin	5
1.2.1	Chemischer Aufbau und Wirkungsmechanismus.....	5
1.2.2	Anwendungsgebiete und Nebenwirkungen	5
1.2.3	Pharmakokinetik, Metabolisierung und Ausscheidung.....	5
1.3	Flavopiridol.....	6
1.3.1	Chemischer Aufbau und Wirkungsmechanismus.....	6
1.3.2	Anwendungsgebiete, Metabolisierung und Nebenwirkungen	6
1.4	Bortezomib	7
1.4.1	Chemischer Aufbau und Wirkungsmechanismus.....	7
1.4.2	Anwendung und Nebenwirkungen.....	7
1.4.3	Pharmakokinetik, Metabolisierung und Ausscheidung.....	7
1.5	MG-115 (Cbz-leu-leu-norvalinal).....	8
1.6	Tumorbiologie – Regulation von Zellzyklus und Apoptose	8
1.6.1	Der eukaryote Zellzyklus	8
1.6.2	Apoptose.....	12
1.6.3	Nekrose	16
1.7	NfκB – Schaltstelle in der Zelle.....	17
1.7.1	Struktur, Aktivierung und Regulation von NFκB	17
1.7.2	NFκB und Zellproliferation	18
1.7.3	NFκB und Apoptose.....	18
1.7.4	NFκB in Tumorzellen und Möglichkeiten der Tumorthherapie	18
1.8	Synergismus durch die Kombination zytotoxischer Substanzen	19
1.9	Ziel der vorliegenden Arbeit	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Material.....	22
2.1.1	Zelllinien.....	22
2.1.2	Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	22
2.2	Methoden	29
2.2.1	Zellkultur	29
2.2.2	Durchflusszytometrie	31
2.2.3	Zellzyklus-Analyse mit Propidiumiodid	32
2.2.4	Bestimmung des Apoptose-Verhaltens (Annexin-V- und PI-Färbung).....	34
2.2.5	Western Blot zur Bestimmung von apoptoseregulierenden Faktoren.....	36
2.2.6	Analyse der NfκB-Aktivität	43
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Modulation des Zellzyklus	46
3.1.1	Konzentrationsreihen.....	46
3.1.2	Zellzyklusanalyse nach Kombination von Flavopiridol, Bortezomib und MG-115 mit Carboplatin	51
3.2	Induktion von Apoptose.....	58
3.2.1	Annexin-V-Assay zur Analyse der Apoptose-Induktion.....	58

3.2.2	Annexin-V-Assay zur Analyse der Apoptose-Induktion durch die Kombination von Carboplatin mit Flavopiridol, Bortezomib und MG-115.....	62
3.3	Western Blot-Analyse von Apoptose-Faktoren	65
3.4	Modulation der NFkB-Aktivität	70
4	Diskussion.....	73
4.1	Wirkung von Carboplatin auf SKOV-3- und BG1-Zellen	73
4.1.1	Zellzyklusanalyse.....	73
4.1.2	Apoptoseinduktion	74
4.1.3	Modulation der NfκB-Aktivität	75
4.2	Wirkung von Flavopiridol auf SKOV-3- und BG1-Zellen.....	76
4.2.1	Zellzyklusanalyse.....	76
4.2.2	Apoptoseinduktion	76
4.2.3	Modulation der NfκB-Aktivität	78
4.3	Wirkung von Proteasomen-Inhibitoren auf SKOV-3- und BG1-Zellen.....	78
4.3.1	Zellzyklusanalyse.....	78
4.3.2	Apoptoseinduktion	80
4.3.3	Modulation der NfκB-Aktivität	82
4.4	Synergismus durch Kombination zytotoxischer Substanzen?	83
5	Zusammenfassung	88
6	Abstract	91
7	Literaturangaben.....	93
8	Anhang	i
8.1	TNM-Einteilung und FIGO-Stadien des Ovarialkarzinoms	i
8.2	Abkürzungsverzeichnis.....	ii
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	iii
8.4	Tabellenverzeichnis	v
8.5	Erklärung an Eides Statt	vi
8.6	Verzeichnis der akademischen Lehrer	vii

1 Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie, Pathogenese und Pathologie

Das Ovarialkarzinom zählt weltweit zu den führenden Todesursachen der Frau und macht etwa 4,2% aller weiblichen Krebs-assoziierten Todesfälle aus [44]. Es ist nach dem Korpuskarzinom der zweithäufigste Genitaltumor und in Deutschland mit circa 4,7% die fünfthäufigste Krebserkrankung der Frau. Rund 10.000 Frauen erkranken jährlich hierzulande an einem bösartigen Tumor der Ovarien. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 67 und 68 Jahren, wobei die Inszidenz mit zunehmendem Alter steigt [10].

Die Prognose der am Ovarialkarzinom erkrankten Frauen ist sehr schlecht, denn zum Zeitpunkt der Diagnosestellung befinden sich bereits etwa 75% der Patientinnen in einem fortgeschrittenen Tumorstadium (FIGO III/IV). Nur bei knapp einem Viertel der Patienten wird der maligne Tumor im prognostisch günstigen Stadium I diagnostiziert. Dies erklärt, weshalb die 5-Jahres-Überlebensrate aller Stadien nur circa 45% beträgt [45].

1.1.2 Diagnose und Stadieneinteilung

Frühsymptome gibt es beim Ovarialkarzinom keine, sodass die meisten Patientinnen erst in einem bereits fortgeschrittenen Tumorstadium mit sehr unspezifischen Symptomen, wie Zunahme des Bauchumfangs oder gastroenterischen Beschwerden, den Arzt aufsuchen [38].

Zu 80% kann man bei am Ovarialkarzinom erkrankter Frauen im Frühstadium erhöhte Werte des hochmolekularen Glykoproteins CA-125 im Serum nachweisen [8]. Bei einem Ausgangswert von >500 U/ml verschlechtert sich die Prognose rapide [50]. Dieser Tumormarker wird im Rahmen der Therapie als Verlaufkontrolle herangezogen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass CA-125 auch durch Rauchen und bei anderen Erkrankungen, wie intraabdominellen Entzündungen, Endometriose und gutartigen Ovarialtumoren, erhöht sein kann [9].

Derzeit kann ein generelles Screening auf das Vorliegen eines Ovarialkarzinoms mittels Transvaginalsonographie und Bestimmung des CA-125 im Serum nicht empfohlen werden. Auch innerhalb einer Hochrisikopopulation wird die Mortalität dadurch nicht gesenkt [28]. Nach Lokalisation und Ausdehnung werden

1 Einleitung

Ovarialkarzinome von der WHO und der FIGO in vier klinische Stadien eingeteilt (siehe Anhang) [73].

1.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren

Trotz vieler Fortschritte im Verständnis der Tumorbilogie ist die Ätiologie des Ovarialkarzinoms noch weitgehend unklar. Die Karzinogenese scheint multifaktoriell bedingt zu sein. Die Mehrheit der Ovarialkarzinome sind sporadische Erkrankungen ohne nachweisbaren Erbgang. In diesen Tumoren finden sich meist somatische Mutationen verschiedener Gene. Dazu zählen Allelverluste diverser Tumorsuppressor-Gene oder auch die Aktivierung von Onkogenen [15]. Das hereditäre Ovarialkarzinom macht ca. 5% aller Neuerkrankungen aus. Es wird ein positiver Zusammenhang mit dem Mammakarzinom, wie auch mit dem Kolon- und Rektumkarzinom beschrieben [57]. In bis zu 90% dieser Tumoren finden sich Keimmutationen der Mammakarzinom-assoziierten Gene BRCA1 (hohe Penetranz, auf dem Chromosom 17q lokalisiert) und BRCA2 (niedrigere Penetranz, Chromosom 13q), sowie in 10-15% Mutationen der mismatch repair-Gene im Rahmen des Lynch-Syndroms (= Hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom) [57].

Zu den anerkannten Risikofaktoren für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms zählen neben Alter und Nulliparität, auch die familiäre Belastung mit Ovarialkarzinomen [63]. Eine Risikozunahme an einem Ovarialkarzinom zu erkranken bei Adipositas, Rauchen und Alkoholkonsum ist bislang nicht eindeutig belegt. Auch bezüglich früher Menarche und später Menopause sind die Aussagen widersprüchlich. Bei dem damit einhergehenden höheren Ovulationsalter (kumulative Anzahl der Follikelrupturen) kämen als Ursache der Risikoerhöhung sowohl inflammatorische Prozesse am Ovar, sowie Mutationen im Rahmen der ständigen ovariellen Reparaturprozesse nach Follikelruptur in Frage. Schwangerschaften, Stillen und die Einnahme oraler Kontrazeptiva hingegen vermindern die Zahl der ovulatorischen Zyklen, supprimieren den Serumspiegel der gonadotropen Hormone und senken somit das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken [63]. Außerdem gehören die Hysterektomie und Tubenligatur durch den Verschluss der Eintrittspforte für Kanzerogene aus der Umwelt in den Abdominalraum zu den anerkannt protektiven Faktoren [40] [67].

1.1.4 Therapie und klinische Prognose

Die nachfolgend beschriebenen Therapieoptionen basieren auf den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe sowie der Arbeitsgruppe Gynäkologische Onkologie (AGO).

1 Einleitung

Die primäre Therapie des Ovarialkarzinoms umfasst neben der operativen radikalen Tumorentfernung beziehungsweise -reduktion die nachfolgende platinhaltige Chemotherapie. Entfernt werden neben Uterus und beidseitigen Adnexen auch das Omentum majus und die Appendix vermiformis. Außerdem wird eine Spülzytologie der Peritonealflüssigkeit entnommen und die gesamte Bauchhöhle auf mögliche Tumorherde inspiziert und palpiert, sowie Probebiopsien des Peritoneums entnommen. Essentiell ist auch die Entfernung pelviner und paraaortaler Lymphknoten, da bereits im Stadium pT1 in 20% der Fälle Lymphknotenmetastasen vorliegen [62]. Bei der nachfolgenden Chemotherapie zeigten sich Cisplatin und Carboplatin als Kombinationspartner von Paclitaxel äquieffektiv. Jedoch besitzt die Kombination von Carboplatin/ Paclitaxel ein günstigeres Toxizitätsprofil [39]. Seit 2012 ist für die Primärtherapie Bevacizumab in Kombination mit Carboplatin und Paclitaxel ab dem Tumorstadium FIGO IIIb und höher eine Option; als Erhaltungstherapie wird Bevacizumab nach Abschluss der Chemotherapie alleine bis zu insgesamt 15 Monaten gegeben [64] [20].

Der Krankheitsverlauf und die Prognose des Ovarialkarzinoms sind abhängig vom Zeitpunkt der Diagnosestellung und somit vom klinischem Stadium, sowie der durchgeführten Primärtherapie. Ziel ist es, mit radikaler Operation die komplette Reduktion des Tumors zu erreichen oder, bei fortgeschrittenem Karzinom, eine Größe des Resttumors von <1cm, um so die mittlere Überlebenszeit signifikant zu verlängern [24].

1.1.5 Neue Therapieansätze

Viele neu entwickelte Substanzen haben initial gute Therapieergebnisse im Rahmen der postoperativ durchgeführten Chemotherapie des Ovarialkarzinoms gezeigt. Trotz verbesserter Therapieplanung und -durchführung erleiden jedoch nach wie vor 65% aller Patientinnen ein Tumorrezidiv und versterben [72]. Das weitere therapeutische Vorgehen bei solchen Rezidiverkrankungen wird durch die Sensibilität der Tumorzellen gegenüber der platinhaltigen Chemotherapie bestimmt. Ein Rückfall >6 Monate nach der letzten platinhaltigen Chemotherapie wird als platinsensitives Spätrezidiv bezeichnet und der Therapiestandard ist hier eine erneute platinhaltige Chemotherapie. Bei rezidivfreiem Intervall <6 Monaten nach Abschluss der Primärbehandlung oder Tumorprogression unter Primärtherapie spricht man von einem platinresistenten Tumor. Lange ist man davon ausgegangen, dass diese Patientinnen von einer erneuten platinhaltigen Therapie nicht profitieren [34]. Neuere Studien zeigen jedoch, dass diese Tumoren durchaus auf eine dosisintensivierte Chemotherapie

1 Einleitung

(niedrigerer Dosierung mit kürzeren Intervallen zwischen den einzelnen Zyklen bei gleicher Gesamtdosis) mit Carboplatin/ Paclitaxel ansprechen [76]. Nach Empfehlung der AGO ist derzeit die nicht platinhaltige Monotherapie weiterhin noch Mittel der ersten Wahl bei Platin-resistenten Ovarialkarzinomen, wobei Topotecan, pegyliertes liposomales Doxorubicin, Paclitaxel und Gemcitabine vergleichbare Effekte zeigen. Selten, nur bei gutem Allgemeinzustand der Patientin und der Aussicht auf vollständige Tumorentfernung, ist bei Patientinnen mit platin sensitivem Spätrezidiv eine erneute tumorreduktive Operation sinnvoll (AGO-Leitlinie; Stand Juni 2013).

In den vergangenen Jahren haben verschiedene Substanzen auf Basis multizentrischer Studien das Therapiespektrum für die Rezidivtherapie des Ovarialkarzinoms entscheidend erweitern können. Dazu zählt neben Gemcitabin auch das liposomal pegylierte Doxorubicin (ASCO 2011). Neben den klassischen Chemotherapeutika werden auch vermehrt Studien initiiert zur Charakterisierung der Wirksamkeit und Wechselwirkungen von so genannten zielgerichteten Therapeutika. Dies sind Substanzen, die gezielt in Stoffwechsel- und Signaltransduktionswege eingreifen und so das Wachstum, die Migration oder Invasion von Tumorzellen verhindern können. Zu den momentan in der Therapie des Ovarialkarzinoms getesteten zielgerichteten Therapeutika zählen neben dem humanen monoklonalen VEGF-Antikörper Bevacizumab und dem VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Sorafenib auch einige PARP-Inhibitoren (Abb. 1) [7].

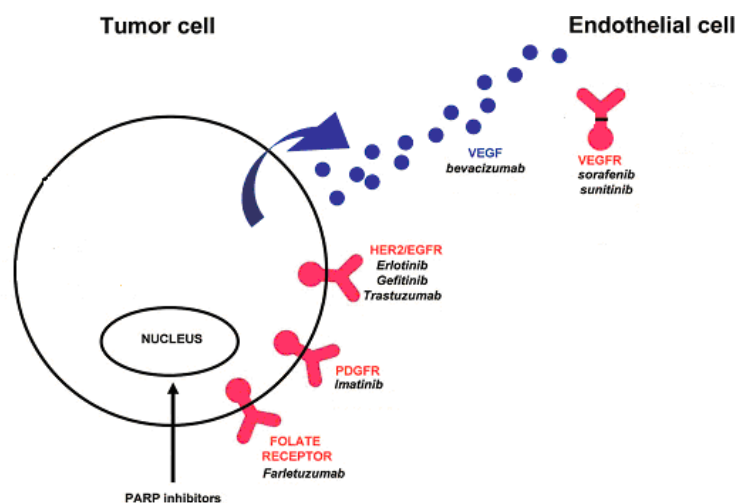


Abb. 1 Auswahl einiger in Phase II-III-Studien untersuchter zielgerichteter Therapeutika bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom, modifiziert nach [7]

1 Einleitung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, weitere Therapieoptionen in der Behandlung des Ovarialkarzinoms aufzuzeigen. Dadurch könnte die Therapie optimiert und das Überleben der Patientinnen verbessert werden.

1.2 Carboplatin

1.2.1 Chemischer Aufbau und Wirkungsmechanismus

Carboplatin ist ein Platinderivat der zweiten Generation. Es besitzt den gleichen Wirkmechanismus wie das ältere Cisplatin, zeichnet sich jedoch durch unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften und ein günstigeres Nebenwirkungsprofil aus. Durch Carboplatin kommt es, ähnlich wie bei alkylierenden Verbindungen, zu Verknüpfungen innerhalb eines DNS-Stranges (intramolekular), aber auch zur Vernetzung zwischen benachbarten DNS-Strängen (intermolekular) und DNS mit Proteinen. Dadurch wird die Zellteilung gehemmt [84].

1.2.2 Anwendungsgebiete und Nebenwirkungen

Derzeit ist Carboplatin für die Mono- oder Kombinationstherapie des Ovarialkarzinoms, des kleinzelligen Bronchialkarzinoms, des Zervixkarzinoms und für Tumoren im Kopf-Hals-Bereich zugelassen [68]. Neben der bereits etablierten Kombination mit Taxanen bei der Therapie des Ovarialkarzinoms konnten in verschiedenen klinischen Studien auch mit der Kombination von Platinderivaten und Gemcitabin, sowie Topotecan gute Erfolge erzielt werden [16].

Dosislimitierende Nebenwirkung von Carboplatin ist die Myelosuppression mit teils ausgeprägter Thrombozytopenie. Eine weitere Nebenwirkung ist die Übelkeit, die meist mäßig stark und gut therapierbar ist. Nephrotoxizität, Ototoxizität und die Schädigung peripherer Nerven sind bei Anwendung von Carboplatin weniger stark ausgeprägt als unter Cisplatin [68].

1.2.3 Pharmakokinetik, Metabolisierung und Ausscheidung

Carboplatin wird intravenös als Kurzinfusion oder auch topisch, bei intraperitonealer Chemotherapie, verabreicht. Innerhalb von 24 Stunden nach Gabe einer Dosis sind 85% des Platins an Proteine im Plasma gebunden.

Carboplatin wird hauptsächlich über die Niere ausgeschieden, wobei 30% der Dosis in unveränderter Form ausgeschieden werden. Die Halbwertszeit beläuft sich für freies Platin auf 3-6 Stunden, für Gesamtplatin auf etwa 24 Stunden. Bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion sind eine Anpassung der Dosis sowie eine engmaschige Überwachung der Hämatopoese und Nierenfunktion erforderlich. Bei

1 Einleitung

einer glomerulären Filtrationsrate von $\leq 20 \text{ ml/Min.}$ darf Carboplatin nicht mehr angewendet werden [65].

1.3 Flavopiridol

1.3.1 Chemischer Aufbau und Wirkungsmechanismus

Flavopiridol gehört zur Gruppe der Flavone (gelbe Pflanzenfarbstoffe) und ist ein Cyklin-abhängiger-Kinase-Inhibitor. Das halbsynthetische flavonoide Alkaloid konkurriert direkt mit ATP um dessen Bindungsstelle und inhibiert so zahlreiche Cyklin-abhängige Kinasen (CDKs) [75]. Die stärkste Hemmung übt Flavopiridol auf die CDKs 1, 4 und 9 aus, sowie etwas schwächer auf die CDKs 2 und 7. Dadurch kommt es zum Zellzyklus-Arrest in der G1 oder G2/M-Phase und Inhibition des Tumorwachstums [61]. Man geht davon aus, dass diese Arretierung der sich teilenden Zellen in der G1 und G2/M-Phase auf der Inhibition der CDK 1 und 2 basiert.

Flavopiridol führt außerdem nicht nur zu einer Downregulation von antiapoptotischen Proteinen, sondern auch zur verminderten Aktivität der RNA-Polymerase II mit nachfolgender Verminderung der Genaktivierung und ansteigender Apoptose-Rate. Auch konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit Flavopiridol bei Zellen der Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL) über die Aktivierung der Caspase 3 zum Zelltod führt [59]. Es wird vermutet, dass Flavopiridol noch weitere zytotoxische Eigenschaften besitzt, die nicht nur auf proliferierende Zellen beschränkt sind. So ist das Flavonoid in der Lage die Sensibilität von Tumorzellen für andere Chemotherapeutika zu erhöhen und so deren Wirkung zu verstärken [42].

1.3.2 Anwendungsgebiete, Metabolisierung und Nebenwirkungen

Derzeit wird die Anwendung von Flavopiridol in klinischen Studien zur Therapie der CLL getestet. Es zeigten sich bisher viel versprechende Ergebnisse mit dauerhafter Remission, vor allem bei Patienten mit therapierefraktären und bereits vorbehandelten Erkrankungen [59]. In ersten Studien wird auch bei soliden Tumorerkrankungen der Einsatz von singulärem Flavopiridol [69], ebenso wie die mögliche Kombination mit anderen, in der Tumorthapie bereits etablierten Chemotherapeutika, getestet [85].

Dosis-limitierender Faktor der Flavopiridol-Therapie ist das akute Tumorlyse-Syndrom, bei dem es durch raschen Zellerfall zu einer massiven Freisetzung von Zellbestandteilen kommt. Gefährlich ist vor allem die daraus resultierende Hyperkaliämie [22].

1 Einleitung

Flavopiridol wird in der Leber glukuronidiert, über die Galle ausgeschieden und dem enterohepatischen Kreislauf zugeführt. Dies ist die Ursache für die Hauptnebenwirkung Diarrhoe. Ebenfalls durch den hepatozellulären Metabolismus des Flavopiridols bedingt scheint die reversible konjugierte Hyperbilirubinämie. Beide Substanzen, konjugiertes Flavopiridol und Bilirubin, konkurrieren um den gleichen Transporter, über den sie in die Galle abgegeben werden. Unter Therapie mit Flavopiridol kommt es so zum Anstieg des konjugierten Serum-Bilirubins [43].

1.4 Bortezomib

1.4.1 Chemischer Aufbau und Wirkungsmechanismus

Bortezomib ist ein selektiver und reversibler Inhibitor des 26S-Proteasoms eukaryonter Zellen und zählt somit zur Gruppe der zielgerichteten Therapeutika. Proteasomen dienen dem enzymatischen Abbau zelleigener Proteine. Die Hemmung des Proteasoms führt zur Akkumulation von eigentlich zur Lyse bestimmter Proteine im endoplasmatischen Retikulum und schließlich zum Zelltod [56]. So werden viele Signalwege innerhalb der Zelle durch die unerwünschte Proteinansammlung und deren fehlenden Abbau modifiziert.

1.4.2 Anwendung und Nebenwirkungen

Bei Patienten des multiplen Myeloms, die für eine Stammzelltransplantation nicht geeignet sind, ist Bortezomib in der First-Line-Therapie in Kombination mit Melphalan und Prednison zugelassen. Auch in der Second-Line-Therapie wird es alleine oder in Kombination mit liposomalem Doxorubicin nach Stammzelltransplantation eingesetzt [68]. In den USA ist Bortezomib mittlerweile auch für die Therapie des rezidivierenden Mantelzelllymphoms zugelassen [56].

Wichtige Nebenwirkungen sind neben gastrointestinalen Beschwerden wie Übelkeit und Diarrhoe, auch eine reversible Thrombozytopenie, sowie periphere Polyneuropathien. Die Neuropathien sind jedoch durch rechtzeitige Modifikation der Dosis meist reversibel [56].

1.4.3 Pharmakokinetik, Metabolisierung und Ausscheidung

Bortezomib wird intravenös verabreicht und liegt im Serum zu 83% Protein-gebunden vor. Abgebaut wird der Proteasomen-Inhibitor über Isoenzyme der CYP450-Gruppe in der Leber und anschließend über Galle und Niere ausgeschieden. Auch ein CYP450-Isoenzym-unabhängiger Metabolisierungsweg ist beschrieben worden [56].

1.5 MG-115 (Cbz-leu-leu-norvalinal)

Ebenfalls zu den 26S-Proteasomen-Inhibitoren zählt MG-115. Wie auch bei Bortezomib kommt es durch die reversible Inhibition der Chymotrypsin-Domäne des Proteasoms zur Akkumulation von eigentlich zum Abbau bestimmter Proteine. MG-115 führt so zu einem Zellzyklus-Arrest der Tumorzellen in der G1/S-Phase und im Metaphase-Übergang, sowie einer verzögerten Passage der S-Phase [58].

Außerdem kommt es durch intrazelluläre Akkumulation von regulatorischen Proteinen, wie p53 oder Proteinen der Bcl2-Familie, zur Apoptose der behandelten Zellen [30] [36]. Bislang gibt es keine klinische Anwendung von MG-115.

1.6 Tumorbilogie – Regulation von Zellzyklus und Apoptose

In normalem, sich regelmäßig regenerierendem Gewebe besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Zelluntergang. Durch komplexe Regulationsmechanismen und Signalkaskaden werden beide Systeme kontrolliert. Kommt es zur ungehemmten Aktivierung des Zellzyklus über proliferationsfördernde Signalwege oder Wegfall von Signalen zur Aktivierung der Zelltod-Kaskade, gerät diese Homöostase aus dem Gleichgewicht und die Entstehung von Tumorerkrankungen wird begünstigt [31].

1.6.1 Der eukaryonte Zellzyklus

Der Zellzyklus einer Zelle erstreckt sich von einer Zellteilung zur nächsten und besteht aus Interphase und Mitose (Zellkernteilung). Eine frisch geteilte Zelle kann entweder einen weiteren Zyklus des aktiven Wachstums und der anschließenden Teilung in zwei identische Tochterzellen durchlaufen oder aber in einen inaktiven Ruhezustand übergehen (G0-Phase) (Abb. 2). Entscheidend dafür ist das Milieu, in dem sich die Zelle befindet, und die auf sie einwirkenden Stimuli in Form von Wachstumsfaktoren etc. [86]. Zellen in der G0-Phase wiederum können durch diverse Stimuli jederzeit entweder zum Wiedereintritt in die aktive Teilungsphase angeregt werden oder aber sie differenzieren sich zu reifen, nicht mehr teilungsfähigen Zellen.

1 Einleitung

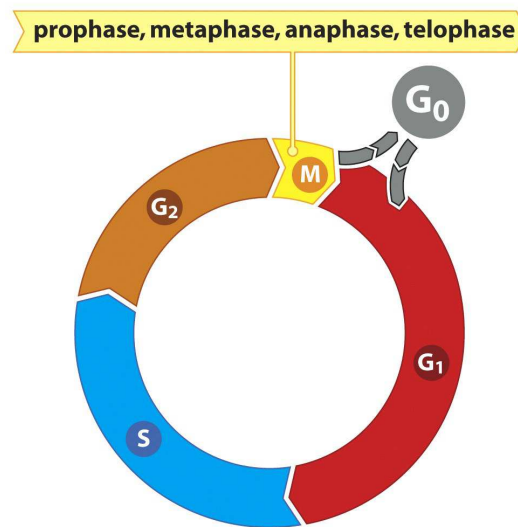


Abb. 2 Die Phasen des Zellzyklus [86]

Bleibt eine Zelle im aktiven Zellteilungszyklus, kommt es in der G₁-Phase durch die exzessive Proteinsynthese zum Zellwachstum als Vorbereitung auf die bevorstehenden weiteren Teilungsschritte. In der sich anschließenden S(=Synthese)-Phase wird das gesamte Erbgut der Zelle verdoppelt (=Replikation) um schließlich gleichmäßig auf zwei Tochterzellen verteilt zu werden. Dies nimmt je nach Zelltyp unterschiedlich viel Zeit in Anspruch [86]. Nach der DNS-Synthese durchläuft die Zelle eine kurze Phase, in der das Erbgut auf Fehlerhaftigkeit überprüft und gegebenenfalls repariert wird (G₂). Schließlich, wenn die Replikation korrekt verlaufen ist, tritt die Zelle in die eigentliche Teilungs-Phase (M=Mitose) ein, in der alle Zellbestandteile, einschließlich verdoppelter DNS, auf zwei identische Tochterzellen verteilt werden. Zwischen den einzelnen Phasen des Zellzyklus liegen so genannte Restriktionspunkte, an denen die Zelle auf ihre genetische Integrität überprüft wird. Bei Schäden kommt es entweder zum Zellzyklusarrest, um Reparaturen zu ermöglichen, oder zum Einleiten der Apoptose, da die Gefahr der malignen Transformation besteht. Die genaue Abfolge der einzelnen Zellzyklusphasen wird durch ein fluktuierendes System von Enzymen, den Cyklin-abhängigen Kinasen und deren Substraten, den Cyklinen, zeitlich genau geregelt (Abb. 3 + 4) [86].

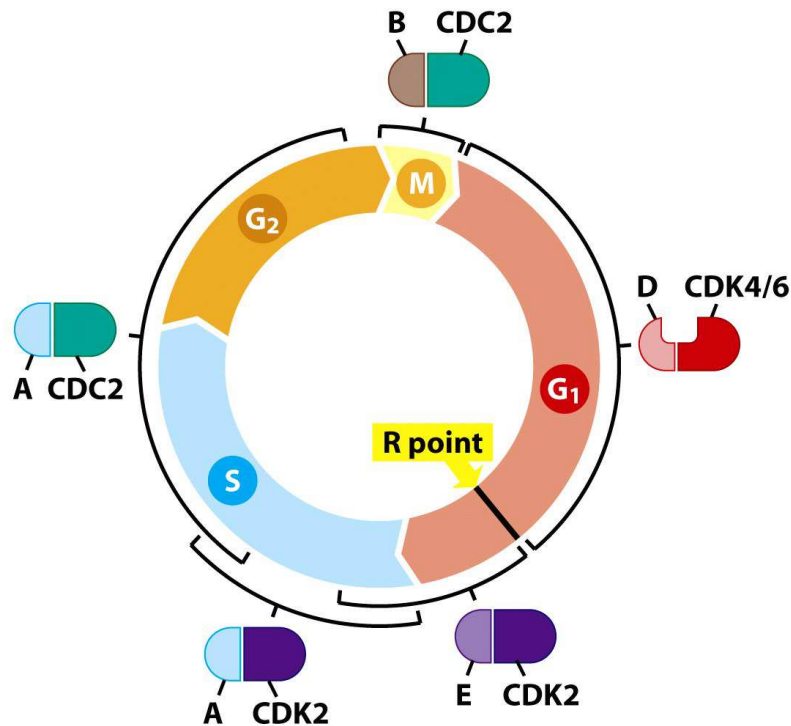


Abb. 3 Paarung der Cykline mit den komplementären CDKs; dabei geben die Klammern den Zeitraum während des Zellzyklus an, in denen die einzelnen Cyclin-CDK-Komplexe aktiv sind [86].

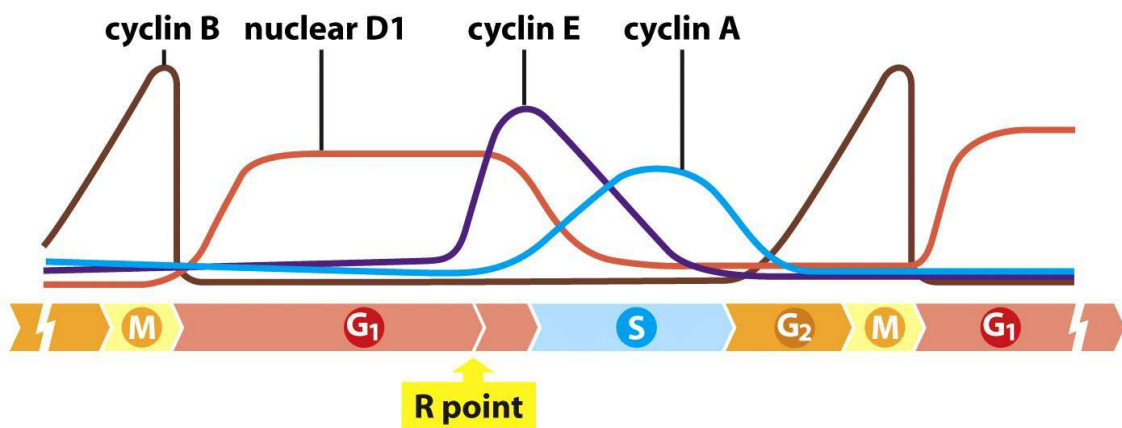


Abb. 4 Fluktuation der Cyclin-Konzentrationen während des Zellzyklus [86].

Neuere Daten haben gezeigt, dass die CDKs eine zentrale Rolle bei der Überwindung der Restriktionspunkte und der Initiierung von DNS-Reparaturmechanismen spielen. Deshalb stellt die Anwendung von CDK-Inhibitoren wie zum Beispiel Flavopiridol, eine neue Option in der Behandlung von Tumorerkrankungen dar. Durch die Inhibition der CDKs kommt es zum Zellzyklus-Arrest und die DNS-Reparaturmechanismen werden außer Kraft gesetzt (Abb. 5). Dies bietet die ideale Voraussetzung für die Kombination von CDK-Inhibitoren mit DNS-schädigenden Chemotherapeutika, wie zum Beispiel

1 Einleitung

Carboplatin [46]. Durch Vernetzung der DNS untereinander und mit umliegenden Proteinen kommt es durch das Platinderivat zur Inhibition der Replikation und Translation mit Zellzyklus-Arrest in der S-Phase [26]. Die zusätzliche Therapie mit CDK-Inhibitoren führt dann, mangels intakter DNS-Reparaturmechanismen, zum Tod der Zelle [46].

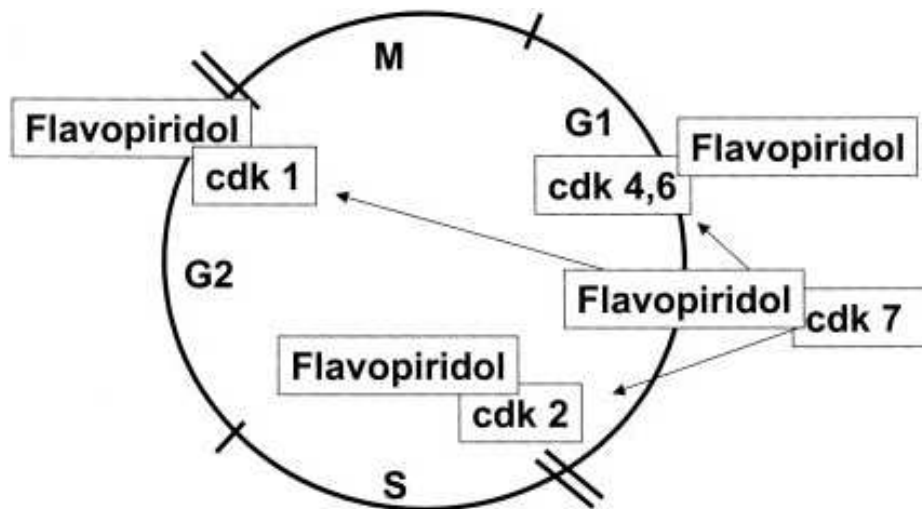


Abb. 5 Cyclin-abhängige Kinase (CDK)-Inhibition durch Flavopiridol im Verlauf des Zellzyklus. Das Flavonoid inhibiert CDKs, die den Zellzyklus steuern (CDK 4,6,2 und 1). Dies führt zur Arretierung des Zellzyklus in der G1 und G2/M-Phase. Man geht davon aus, dass dies auf der Inhibition der CDK 1 und 2 an den beiden Restriktionspunkten des Zellzyklus basiert. Außerdem wird durch Flavopiridol die Phosphorylierung der CDK 7 gehemmt, welche ihrerseits zur Aktivierung weiterer CDKs führen würde [75].

Diverse präklinische und klinische Studien haben bereits die Effekte von CDK-Inhibitoren in Kombination mit DNS-schädigenden Chemotherapeutika auf Tumorzellen untersucht, mit teilweise kontroversen Ergebnissen. So konnten Baumann et al. einen synergistischen antiproliferativen Effekt auf SKOV-3 und BG1-Zellen für die Kombination von Flavopiridol mit Carboplatin nachweisen [11]. Auch Bible et al. konnten an Patientinnen mit rezidivierendem Ovarialkarzinom zeigen, dass die Kombination aus Platinhaltiger Chemotherapie mit Flavopiridol erfolgsversprechende Ergebnisse liefert [13]. Es werden weitere randomisierte Studien nötig sein, um zu klären, ob die Flavopiridol-induzierte CDK-Inhibition, eventuell auch in Kombination mit anderen Substanzen, eine antiproliferative Aktivität gegen Zellen solider Tumoren zeigt [46].

Proteasomen-Inhibitoren führen durch die Akkumulation von ubiquinierten Proteinen zum nahezu kompletten Zellzyklusarrest [58]. Zum korrekten Ablauf des Zellzyklus ist die zyklische Expressierung der unterschiedlichen Cykline, gefolgt durch deren Abbau,

1 Einleitung

von entscheidender Bedeutung (Abb. 3+4). Kommt es durch Blockierung der Proteasomen-Aktivität beispielsweise zum fehlenden Abbau von ubiquinierten CyklinB-CDK2-Komplexen in der frühen M-Phase, bricht das Regulationssystem des Zellzyklus zusammen und die Zelle arretiert in der Metaphase [58]. Am Übergang von der S-Phase zur G1-Phase ist die Aktivität des CyklinE-CDK2-Komplexes entscheidend. Während der Komplex in der frühen G1-Phase noch durch das Protein p27 inaktiviert wird, ist der Weg durch die Degradierung dieses CDK-Inhibitors in die S-Phase und die DNS-Replikation freigegeben. Durch die Inhibition wiederum der Proteasomen bleibt der Abbau des ubiquinierten p27-Proteins aus und die Zelle arretiert am G1/S-Übergang [58]. Neben dem Zellzyklusarrest in der Metaphase und am Übergang der G1/S-Phase, kommt es durch Behandlung mit Proteasomen-Inhibitoren auch zu einem verlangsamten Ablauf der S-Phase. Vermutet wird hier, dass der in der S-Phase vorrangig aktive CyklinA-CDK2-Komplex durch Proteine reguliert wird, die wiederum von der Proteasomen-Degradation abhängig sind. Auch findet während der S-Phase die Degradierung der Histone statt, sodass die Replikation unter Einfluss von Proteasomen-Inhibitoren durch ungenügendes Entpacken der DNS nicht wie gewohnt ablaufen kann. Es wird außerdem die Beteiligung anderer Proteine am Zellzyklusarrest, induziert durch Proteasomeninhibitoren, diskutiert [58]. Der geregelte Ablauf des eukaryonten Zellzyklus ist an vielen Stellen manipulierbar, was man sich in der Tumorthherapie durch den Einsatz von Chemotherapeutika und zielgerichteter Therapeutika zu Nutze macht.

1.6.2 Apoptose

Der Begriff Apoptose wurde erstmals im Jahr 1972 von Wyllie und Kerr geprägt. Es handelt sich um eine Form des Zelluntergangs, die für die Entwicklung von Lebewesen während der Embryonalphase und die spätere Aufrechterhaltung der Gewebemöostase, dem Gleichgewicht von Proliferation und programmiertem Zelltod, wesentlich ist [49].

Morphologisch ist die Apoptose gekennzeichnet durch die Kondensation des Zytoplasmas mit Auftreten intrazytoplasmatischer Granula, sowie der Chromatinkondensation mit anschließendem DNS-Zerfall. Es entstehen so genannte apoptotische Körperchen, die schließlich fragmentiert, phagozytiert und von umliegenden Zellen abgebaut werden. Im Gegensatz zur Nekrose unterbleibt die unkontrollierte Freisetzung des Zellinhalts an die Umgebung mit nachfolgender entzündlicher Reaktion durch aktivierte Zellen des Immunsystems. Somit ist die Apoptose eine für den Organismus sehr schonende Art des Zelluntergangs [49].

1 Einleitung

Neben Chemotherapeutika, (radioaktiver) Strahlung und Hyperthermie gehören Hormonentzug und die zusätzliche Hormongabe zu den bereits früh identifizierten Apoptoseauslösern [37]. Auch zytotoxische Lymphozyten und Bindung von spezifischen Liganden an die jeweils komplementären Oberflächenrezeptoren können Apoptose in der Zielzelle induzieren. Für die Initiierung des programmierten Zelltods ist die Funktion der so genannten Caspasen, einer Familie Aspartat-spezifischer Cystein-Proteasen, von entscheidender Bedeutung. Sie werden während des Apoptosevorgangs kaskadenartig aktiviert und führen zur gezielten Spaltung von Substraten der Apoptose-Maschinerie [23].

Es existieren zwei Hauptsignalwege, die zur Aktivierung der Caspasen führen. Dies ist neben dem extrinsischen beziehungsweise Todesrezeptor-Signalweg der intrinsische, mitochondriale Signalweg (Abb. 6) [19].

1.6.2.1 Der extrinsische Apoptose-Signalweg

Durch Bindung von spezifischen Liganden an die entsprechenden transmembranösen Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche der Zielzelle, kommt es auf der Membraninnenseite zur Trimerisierung des Rezeptors. An diese können nun Rezeptor-assoziierte Moleküle aus dem Zytoplasma binden. So führt zum Beispiel die Bindung des Fas-Liganden, einem transmembranen Protein aus der Familie des Tumor Nekrose Faktors (TNF), an seinen spezifischen Rezeptor zur intrazytoplasmatischen Bindung des Adapter-Moleküls FADD. Dieses wiederum bindet die inaktive Proform der Caspase 8, führt zu deren autolytischen Spaltung mit nachfolgender Aktivierung [19]. Die freigesetzte Caspase 8 aktiviert nun ihrerseits die Effektor-Caspase 3. Diese induziert nicht nur die Spaltung vieler Substratproteine, welche am zellulären und nukleären Untergang wesentlich beteiligt sind, sondern sie aktiviert auch andere Caspasen. Dadurch kommt es zur Signal-verstärkenden Rückkopplung [87].

1.6.2.2 Der intrinsische Apoptose-Signalweg

Neben toxischen Substanzen, wie Chemotherapeutika, oxidativem Stress oder der exzessiven Erhöhung intrazellulären Calciums kann auch die Aktivierung von Todesrezeptoren an der Zelloberfläche (siehe 1.6.2.1) zur Freisetzung von Cytochrom C aus der Mitochondrien-Membran ins Zytosol führen. In einem Komplex zusammen mit dATP und Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1), dem so genannten Apoptosom, wird die autolytische Aktivierung der Prokaspase 9 ermöglicht. Diese aktiviert dann ihrerseits analog zur Caspase 8 im extrinsischen Apoptose-Signalweg

1 Einleitung

die Effektor-Caspase 3 und die Zelle geht zugrunde [19] [86]. Bekannte Regulatoren der Cytochrom C-Freisetzung aus der inneren Mitochondrienmembran ins freie Zytosol sind Proteine der Bcl-2-Familie. Einige Mitglieder dieser Familie fördern die Apoptose, andere wiederum verhindern die Aktivierung des programmierten Zelltods. So führt die Überexpression von Bcl-2 und Bcl-xL zur Blockierung der Cytochrom C-Freisetzung und verhindert damit die Apoptose. Im Gegensatz dazu fördern andere Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie, wie Bax oder Bid, die Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien und führen zur Aktivierung der Apoptose-Maschinerie [19].

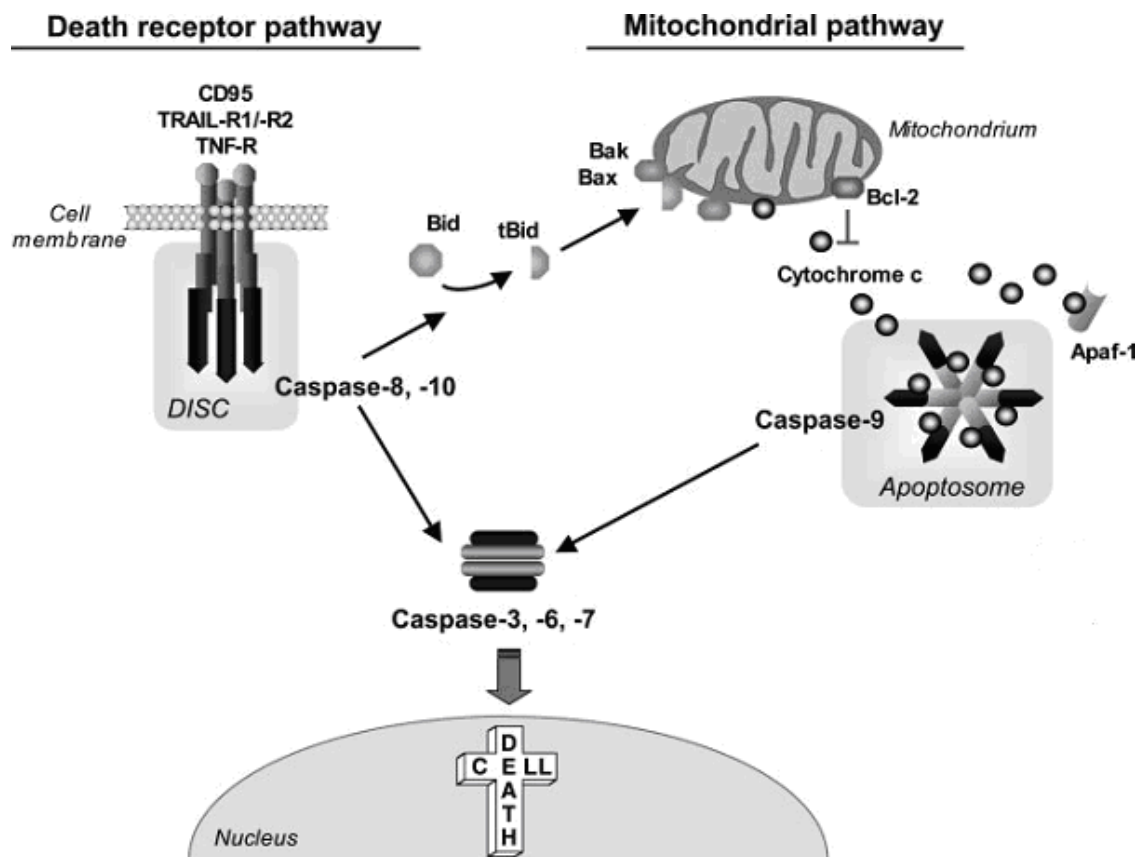


Abb. 6 die zwei Hauptsignaltransduktionswege der Apoptose;

Links der extrinsische oder Todesrezeptor-Signalweg: vermittelt durch eine Untergruppe der TNF-Rezeptor-Familie (TRAIL-R1/2, TNF-R1 etc.). Binden komplementäre Adapterproteine an diese Rezeptoren, kommt es zur Aktivierung einer Signalkaskade mit Aktivierung der Caspase 8, welche ihrerseits wiederum die Caspasen 3, 6 oder 7 aktiviert und so die Apoptose auslöst. Außerdem führt die aktivierte Caspase 8 über einen Seitenweg ebenfalls zur Cytochrom C-Freisetzung.

Rechts der intrinsische oder mitochondriale Signalweg: zellulärer Stress oder die proapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie Bax und Bak führen nach Aktivierung im Zytosol durch das Bid-Protein zu einer Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Es kommt zum Zusammenschluss von Cytochrom C, Apaf-1 und der Caspase 9 zum so genannten Apoptosom, welches zur Aktivierung der Caspase 3 und anschließend zum Zelltod führt [32].

1 Einleitung

Für erfolgreiche Therapien zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen sind die Aufklärung von Apoptose-Signalwegen und die Erforschung der Möglichkeiten zur Intervention von enormer Bedeutung. Viele dieser durch Chemotherapeutika aktivierte Apoptose-Mechanismen werden noch kontrovers diskutiert.

Kommt es durch Carboplatin zur Vernetzung zwischen benachbarten DNS-Strängen, führt dies zu erheblichen Schäden innerhalb des Erbguts. Zellen höherer Organismen haben deshalb Strategien entwickelt, die es ihnen ermöglicht ihre genomische Integrität aufrecht zu erhalten. Eine Schlüsselposition nimmt hierbei das p53-Protein ein [86]. Durch Schädigung der DNS kommt es zur Aktivierung beziehungsweise Stabilisierung dieses Tumorsuppressorproteins. Dies führt einerseits zum Wachstumsarrest der Zelle, welcher die Reparatur der geschädigten DNS ermöglicht. Andererseits kann eine irreparabel geschädigte Zelle durch Apoptose eliminiert werden [86]. Ziel des in der Tumorthherapie eingesetzten Carboplatins ist es, die Zelle so schwer zu schädigen, dass eine Reparatur des Erbguts nicht möglich ist und die Apoptose-Maschinerie in Gang gesetzt wird. Das p53-Protein führt dann als Transkriptionsfaktor nicht nur zu einer vermehrten Synthese der proapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder, beispielsweise Bax, sondern es transloziert nach zytotoxischem Zellstress auch direkt in Richtung Mitochondrien. Dort interagiert es mit jenen proapoptotischen Bcl-2-Proteinen, welche die Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien initiieren und so den intrinsischen Signaltransduktionsweg aktivieren [83]. Neben dieser antiproliferierenden Wirkung über das p53-Protein gibt es Hinweise dafür, dass Carboplatin auch p53-unabhängig über den intrinsischen, ebenso wie über den extrinsischen Signaltransduktionsweg zur Apoptose führt [14].

Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass Flavopiridol durch die Inhibition Cyklin-abhängiger-Kinasen ausschließlich zytostatisch, also hemmend auf den Zellzyklus wirkt. Neue Studien konnten jedoch zeigen, dass die Substanz auch direkt den Tod zellzyklusaktiver wie -inaktiver Zellen induzieren kann. So kommt es während des regulären Zellzyklus durch Cyclin D- und E-abhängige Kinasen zur Freisetzung des aktiven Transkriptionsfaktors E2F. Dessen anschließende Inaktivierung durch eine weitere Cylin-abhängige Kinase ist essentiell für den korrekten Ablauf des Zellzyklus. Bleibt die Inaktivierung des E2F-Proteins durch Inhibition dieser Kinase aus, kommt es zur Aktivierung der Apoptosemaschinerie. Dies geschieht sowohl über Stabilisierung des p53 Proteins, wie auch p53-unabhängig über die Inhibition antiapoptotischer Signalübertragung [66]. Wie eingangs bereits erwähnt, wird vermutet, dass Flavopiridol noch weitere zytotoxische Eigenschaften besitzt, die nicht nur auf proliferierende Zellen beschränkt sind. Dazu zählen neben Einflussnahme auf endotheliale Zellen auch die

1 Einleitung

Effekte auf Nicht-CDK-Proteine oder die direkte Interaktion mit der DNS [48]. Außerdem ist das Flavonoid in der Lage die Sensibilität von Tumorzellen für andere Chemotherapeutika zu erhöhen und so deren Wirkung zu verstärken [42]. In diversen Phase I-Studien konnte ein synergistischer Effekt auf die Apoptose-Induktion von Flavopiridol in Kombination mit verschiedenen Substanzen, wie Cisplatin oder Paclitaxel, gezeigt werden [48].

Auch Proteasomen-Inhibitoren, wie Bortezomib oder MG-115, können Zellzyklus-abhängig und -unabhängig zum Zelltod führen. Die Hemmung des Proteasoms hat eine Akkumulation von eigentlich zur Lyse bestimmter Proteine im endoplasmatischen Retikulum zur Folge. Durch diesen endoplasmatischen Stress überfordert, leitet die Zelle schließlich den Zelltod ein [56]. So führt der verminderte Abbau von Cyklinen und CDK-Inhibitoren, wie p21 oder p27, zum Erliegen des Zellzyklus und schließlich zur Aktivierung der Zelltod-Maschinerie [80]. Unabhängig vom Ablauf des Zellzyklus kommt es durch die Inkubation mit Proteasomen-Inhibitoren auch zur Anreicherung anderer regulatorischer Proteine, wie zum Beispiel des bereits erwähnten p53 oder aber auch Proteinen der Bcl-2-Familie mit nachfolgender Aktivierung der Apoptose-Kaskade [30] [36].

Diese Beobachtungen konnten für viele humane Karzinomzelllinien nachgewiesen werden, scheinen jedoch abhängig vom Zelltyp zu sein. So haben experimentelle Studien gezeigt, dass Bortezomib bei Zellen der SKOV-3-Ovarialkarzinomzelllinie sowohl über prolongierten Zellzyklusarrest als auch ER-Stress zwar zur Apoptose führt, dies jedoch mit keiner signifikanten Modulation der Expression von anti-apoptotischen Proteine, wie XIAP oder Bcl-XI, einhergeht. Auch eine signifikante Erhöhung von proapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie, wie Puma oder Noxa konnte nicht nachgewiesen werden [17]. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Bortezomib mit diversen Substanzen synergistisch wirkt. Eine experimentelle Studie zur Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) zeigte einen deutlichen Synergismus in der Apoptose-Induktion bei der Kombination von Bortezomib mit Flavopiridol [27]. Auch in Kombination mit Carboplatin war Bortezomib bereits in ersten klinischen Studien erfolgreich und zeigte synergistische Wirkung bei der Aktivierung der Apoptose-Maschinerie [1].

1.6.3 Nekrose

Im Gegensatz zur Apoptose kommt es bei der Nekrose durch starke Schädigung der Zelle zum Ausfall der membranösen Ionenpumpen mit nachfolgendem unkontrollierten Einstrom von Ionen und Wasser. Dies führt zum Anschwellen der Zellen und

1 Einleitung

Zellorganellen und schließlich zur Ruptur der Zellmembran. Diese Zellyse zieht eine inflammatorische Reaktion nach sich [86]. Lange Zeit nahm man an, dass es sich bei der Nekrose um eine unkontrollierte und sich zufällig ereignende Form des Zelltods handelt. Es konnten jedoch Rezeptoren identifiziert werden, die den nekrotischen Zelltod induzieren können [52].

Während Carboplatin in der Lage ist, sowohl Apoptose als auch Nekrose zu erzeugen [51], aktiviert Bortezomib lediglich die Apoptose-Maschinerie und führt, im Gegensatz zu anderen Proteasomen-Inhibitoren, nicht zur Nekrose [33]. Für Flavopiridol liegen lediglich Daten vor, die eine Zunahme der Nekroserate in Kombination mit PRIMA1 (Proline-rich membrane anchor 1) verzeichnen [25].

1.7 NFκB – Schaltstelle in der Zelle

1.7.1 Struktur, Aktivierung und Regulation von NFκB

Der Name NFκB ist eine Sammelbezeichnung für eine Familie von Signaleproteinen, die als Transkriptionsfaktoren für mehr als 150 Gene fungieren. Sie liegen im Zytoplasma der Zellen als Homo- beziehungsweise Heterodimere vor. Das meist verbreitete Heterodimer besteht aus einer p50- und p65-Untereinheit [86]. Normalerweise liegt NFκB im Zytosol inaktiv an seinen Inhibitor, das IκB-Protein, gebunden vor. Verschiedene Stimuli können die Phosphorylierung des Inhibitor-Proteins initiieren mit anschließender Poly-Ubiquitinierung und Degradierung durch das 26S-Proteasom. Das NFκB-Dimer wird so freigesetzt und liegt nun in seiner aktiven Form im Zytosol vor. Es kann jetzt in den Zellkern translozieren und dort seine transkriptionsfördernde Wirkung entfalten [86] [74]. Zu den Stimuli, die das NFκB-Dimer aktivieren können, zählen neben infektiösen Agentien wie Viren oder Bakterien, auch biochemische Reize und zelluläre Botenstoffe wie proinflammatorische Zytokine (TNF, Interleukine, EGF). Auch physikalischer (ionisierende Strahlung, UV-Licht) und chemischer Stress (chemotherapeutische Substanzen) können zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors führen. In gesunden Zellen ist die Aktivierung von NFκB ein episodisches Ereignis, das hauptsächlich durch einen negativen Feedback-Mechanismus reguliert wird. Das aktivierte NFκB induziert unter anderem die Expression seines eigenen Inhibitors IκB. Dieses wandert in den Zellkern, wo es das aktivierte NFκB bindet und als inaktive Form wieder ins Zytoplasma zurück transportiert [74].

1 Einleitung

1.7.2 NFkB und Zellproliferation

Neben diversen Wachstumsfaktoren, wie TNF α , EGF oder auch Interleukine, induziert NFkB auch direkt die Expression von Zellzyklus-regulatorischen Proteinen. Dazu zählt zum Beispiel Cyclin-D, welches für den Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase verantwortlich ist. NFkB hat somit in der gesunden Zelle eine proliferationsfördernde Funktion [74].

1.7.3 NFkB und Apoptose

NFkB kontrolliert auch die Expression verschiedener anti-apoptotischer Proteine. Dazu zählen neben Bcl-2 und Bcl-xL auch das bereits erwähnte XIAP oder andere Inhibitoren der Apoptose. Während Bcl-xL die Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien unterdrückt, kommt es durch die vermehrte Expression von Apoptose-Inhibitoren zur direkten Hemmung von Caspase 3 und 9 und somit zur Unterbrechung der Apoptose-Kaskade [74].

1.7.4 NFkB in Tumorzellen und Möglichkeiten der Tumorthherapie

In Tumorzellen ist die zeitlich limitierte Aktivierung des NFkB-Dimers durch verschiedene molekulare Veränderungen aufgehoben und der Transkriptionsfaktor ist dauerhaft aktiviert. Dies führt in manchen Tumoren zur Entwicklung von Resistenzen gegenüber Radiotherapie und diverser Chemotherapeutika [5]. Zusätzlich induzieren einige zytotoxische Substanzen selbst die Aktivierung des Transkriptionsfaktors und fördern somit ihre eigene Resistenzentstehung.

So konnte gezeigt werden, dass Carboplatin in Ovarialkarzinomzellen durch die Aktivierung von NFkB zur Resistenzentstehung führt. Durch die zusätzliche Behandlung mit Proteasomen-Inhibitoren wie Bortezomib oder MG-132 kommt es zur Inaktivierung des 26S-Proteasoms und der Abbau des NFkB-Inhibitor-Proteins kann verhindert werden. Die inaktive Form des NFkB wird damit stabilisiert, die Resistenzentstehung überwunden und die Sensitivität der Tumorzellen für Chemotherapeutika wie Carboplatin kann erhöht werden [1].

Die Datenlage diesbezüglich ist jedoch keineswegs eindeutig und scheint abhängig vom Zelltyp zu sein. So konnte in experimentellen Studien mit HPV-18 E6-positiven Epithelzellen sogar eine Downregulation des dauerhaft aktivierten NFkB-Dimers durch die Inkubation mit Carboplatin nachgewiesen werden. Das Platinderivat blockiert dort außerdem die NFkB-Bindestelle am Bcl-2-Promoter der DNS und führt so zur verringerten Expression des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins [77].

1 Einleitung

Für Flavopiridol konnte gezeigt werden, dass es die durch diverse Stimuli wie zum Beispiel TNF, Wasserstoffperoxid oder Zigarettenrauch erfolgte NFκB-Aktivierung zeit- und dosisabhängig aufhebt. Dieser Effekt wird vermittelt durch die Inhibition der Phosphorylierung des IκB-Proteins mit anschließend ausbleibender Ubiquitinierung und Degradierung des NFκB-Inhibitors. Auch wird die Translokation des NFκB-Dimers in den Zellkern durch die Inaktivierung von im Zytosol vorliegender Kinasen verhindert [81]. So kommt es durch Flavopiridol neben der Inhibition der CDK-Aktivität auch zu einer verminderten Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 und Zellzyklus-regulierenden Proteinen wie Cyclin-D.

Als Schaltstelle für viele lebenswichtige Signaltransduktionswege in der Zelle bietet die Interaktion mit dem NFκB-Protein einen viel versprechenden Ansatz in der Entwicklung neuer Strategien der Tumorthherapie.

1.8 Synergismus durch die Kombination zytotoxischer Substanzen

In der Medizin versteht man unter dem Begriff Synergismus das Zusammenwirken mehrerer Therapeutika mit daraus resultierender gesteigerter oder neuartiger Wirkung. Durch Synergismus verschiedener Medikamente kann die Dosis der Einzelsubstanzen minimiert und so auf eine bessere Verträglichkeit der Therapie mit weniger Nebenwirkungen gehofft werden [82]. Durch die Kombination von Substanzen miteinander können unterschiedliche Wirkungen erzielt werden. Nach Tallarida kommt es zur additiven Wirkungen mehrerer Medikamente, wenn der Gesamteffekt der Summe der Einzelwirkungen entspricht. Ist die Gesamtwirkung kleiner als die Summe der Einzelwirkungen, so spricht man von subadditiver oder antagonistischer Wirkung. Die Kombination von mehreren Medikamenten führt in diesem Fall also zu einer Abnahme des Effekts. Im Gegensatz dazu erzielt bei der superadditiven oder synergistischen Wirkung die Kombination mehrerer Substanzen einen größeren Effekt als die Summe der Einzelwirkungen [82].

Als Beispiel für das erfolgreiche Zusammenwirken von Medikamenten ist der bis heute geltende Chemotherapiestandard für das Ovarialkarzinom mit Platin und Taxanen. Bereits 1995 führte die Kombination von Platinderivaten mit Taxanen und deren verschiedenen Wirkmechanismen zu ersten Erfolgen und bot einen viel versprechenden Ansatz in der Erforschung möglicher Therapieansätze zur Behandlung des Ovarialkarzinoms [70]. Im Verlauf zeigten schließlich weitere Studien, dass Carboplatin als Kombinationspartner von Paclitaxel im Vergleich mit Cisplatin zwar äquieffektiv ist, die Kombination Carboplatin/ Paclitaxel jedoch ein günstigeres Toxizitätsprofil aufweist [39].

1 Einleitung

Auch die von uns gewählten Substanzen Flavopiridol, Bortezomib und MG-115 in Kombination mit dem in der Therapie bereits etablierten Carboplatin erfüllen die Grundvoraussetzung für synergistische Wirkung; alle Substanzen führen über unterschiedliche Wirkungsmechanismen (ausgenommen Bortezomib und sein Analogon MG-115, beides Proteasomen-Inhibitoren) zum Zellzyklus-Arrest und programmierten Zelltod. Damit sind die theoretischen Voraussetzungen für eine synergistische antiproliferative Wirkung gegeben und werden in dieser Arbeit näher untersucht.

1.9 Ziel der vorliegenden Arbeit

In der Therapie des Ovarialkarzinoms sind Operation und Chemotherapie fest etabliert. Jedoch ist die Rezidivrate, trotz der verbesserten Therapieplanung und -durchführung der vergangenen Jahre, unverändert hoch.

Auf Basis multizentrischer Studien haben verschiedene Substanzen das Therapiespektrum für die Rezidivtherapie des Ovarialkarzinoms entscheidend erweitern können. Gerade wegen der Resistenzentwicklung gegen etablierte Rezidivchemotherapien beim Ovarialkarzinom bedarf es weiterer Therapieoptionen. Im in vitro-Modell mit den zwei humanen Ovarialkarzinom-Zelllinien SKOV-3 und BG1 soll geprüft werden, ob die Substanzen Flavopiridol, Bortezomib und MG-115 einzeln und in Kombination mit dem in der Therapie bereits etablierten Carboplatin Vitalität und Metabolismus der Karzinomzellen beeinflussen. Durch einen möglichen Synergismus der drei Medikamente in Kombination mit Carboplatin könnte die Dosis der Einzelsubstanzen reduziert und so auf eine bessere Verträglichkeit der Therapie gehofft werden.

Dazu werden beide Zelllinien mit Flavopiridol, Bortezomib und MG-115 in verschiedenen Konzentrationen singulär und in Kombination mit Carboplatin versetzt. Bei der Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie wird die Wirkung der Substanzen auf die Anteile der Zellpopulationen an den einzelnen Zellzyklusphasen und ein möglicher Synergismus mit Carboplatin untersucht. Anschließend wird der Apoptoseinduktionsassay (ebenfalls Durchflusszytometrie) zur Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose eingesetzt. Auch hier erfolgt die Analyse nach Inkubation der Zellen mit den Einzelsubstanzen, wie auch in Kombination mit Carboplatin, um mögliche synergistische antiproliferative Effekte zu detektieren. Da die Apoptose-Signalwege mögliche Angriffspunkte in der modernen Tumorthherapie darstellen, ist ein tief greifendes Verständnis der Tumorbilogie und des Einflusses zytotoxischer Substanzen auf jene Signaltransduktionswege essentiell. Deshalb

1 Einleitung

werden aus beiden Hauptsignalwegen der Apoptose exemplarische Proteine ausgewählt, deren Detektion mittels Western Blot über eine mögliche Aktivierung beider Hauptsignalwege Auskunft geben soll.

Als Schaltstelle für viele Signaltransduktionswege bietet das NFκB-Protein einen vielversprechenden Ansatz in der Entwicklung neuer Strategien der Tumorthherapie. Um eine Aussage über eine mögliche Aktivierung des NFκB-Proteins durch die Inkubation mit zytotoxischen Substanzen treffen zu können, wird im Zytosol der Tumorzellen, verglichen mit der Zellkernextraktion weniger aufwendig, mittels ELISA die Aktivität des Transkriptionsfaktors vor seiner Translokation in den Zellkern nach Inkubation mit den Medikamenten untersucht.

Man erhofft sich durch die Versuche dieser Arbeit neue Erkenntnisse in der Erforschung der Tumorbilogie und die antiproliferative Wirkung von Carboplatin, Flavopiridol und den Proteasomeninhibitoren Bortezomib und MG-115.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Die humane Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 wurde von der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn zur Verfügung gestellt. Die Adenokarzinomzelllinie ist resistent gegen den Tumornekrosefaktor (TNF) und diverse Zellgifte, wie Cisplatin, Diphtherie-Toxin und Adriamycin. Für das Tumorsuppressorprotein p53 sind die SKOV-3-Zellen negativ und, trotz exprimierter Östrogenrezeptoren, gegenüber Östrogen-Stimuli insensitiv. Außerdem exprimieren die SKOV-3-Zellen Rezeptoren für epitheliale Wachstumsfaktoren (EGF), sind jedoch gegen den Thyrosinkinase-Inhibitor Iressa, einen Hemmstoff des EGF-Rezeptors, resistent.

Die BG1-Zelllinie entstammt einem schlecht differenzierten ovariellen Adenokarzinom einer Patientin im klinischen Stadium III der Universitäts-Frauenklinik Bonn. Diese Zelllinie exprimiert sowohl Progesteron- als auch Östrogen-Rezeptoren, den Tumormarker CA-125 und ist schwach EGF-Rezeptor positiv.

2.1.2 Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

2.1.2.1 Zellkultur

Geräte

Sterile Arbeitsbank	Bio-II-A	Telstar, Terrassa, Esp
Brutschrank	Hera Cell150	Thermo, Waltham, USA
Wasserbad		GFL, Burgwedel, BRD
Mikroskop	Axiovert 40C	Zeiss, Jena, BRD
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo, Waltham, USA
	Heraeus Biofuge fresco	Thermo, Waltham, USA
Neubauer-Zählkammern		Schreck, Hofheim, BRD
Pipetboy		Integra Bioscience; Ferwald, BRD
Pipetten	Finnpipetten®	Thermo, Waltham, USA
Bunsenbrenner	Fireboy plus	Integra Bioscience; Ferwald, BRD
Stickstofftank	Locator junior plus	Dubuque, USA
Kühlschrank	4°C	Liebherr, Bulle, CH

2 Material und Methoden

Gefrierschrank	-20°C	Liebherr, Bulle, CH
	-80°C	Thermo, Waltham, USA

Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflaschen	Cellstar® 75cm ² , 175cm ²	Greiner bio-one, Frickenhausen, BRD
PP-Röhrchen	15, 50ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, BRD
Zellschaber	mittel, groß	Sarstedt, Newton, USA
Reaktionsgefäße		Eppendorf, Hamburg, BDR
Pipetten	Serologisch, Cellstar® in ml: 1, 2, 5, 10, 25, 50	Greiner bio-one, Frickenhausen, BRD
Pipettenspitzen	Finntip®	Thermo, Waltham, USA
Cryo-Röhrchen	1,8ml, 2ml	Nunc, Roskilde, DK

Chemikalien und Lösungen

RPMI 1640	mit stabilem Glutamin	PAA, Pasching, AU
FCS (fetales Kälberserum)		PAA, Pasching, AU
Penicillin/ Streptomycin		PAA, Pasching, AU
Natrium-Pyruvat		PAA, Pasching, AU
Trypsin-EDTA		PAA, Pasching, AU
Einfriermedium	10% DMSO + 90% FCS	
DMSO		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol		Merck, Darmstadt, BRD
Zellkultur-Färbelösung	54% PBS + 36% Trypanblau 0,4% + 10% Zellsuspension	
PBS		PAA, Pasching, AU
Ampuva		PAA, Pasching, AU
Trypanblau		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.2.2 Durchflusszytometrie

2 Material und Methoden

Geräte

FACS	FACS Calibur	BD, Heidelberg, BRD
Vortexer	MS2 Minishaker	IKA, Staufen, BRD
Wärmeschrank	Heraeus	Thermo, Waltham, USA
Auswertesoftware	Cell Quest Pro	BD, Heidelberg, BRD

Verbrauchsmaterialien

FACS-Röhrchen	5ml	Sarstedt, Nümbrecht, BRD
6-well Kulturplatten	Cellstar®	Greiner bio-one, Frickenhäuser, BRD

Chemikalien und Lösungen

FACS-Clean		BD, Heidelberg, BRD
FACS-Rinse		BD, Heidelberg, BRD
FACS-Flow		BD, Heidelberg, BRD

2.1.2.3 Zellzyklusanalyse

Chemikalien und Lösungen

Carboplatin		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Flavopiridol		Novartis, Basel, CH
Bortezomib		Ortho-Biotech, Neuss, BRD
MG-115 (Cbz-leu-leu-norvalinal)		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

alle bei -20°C gelagert

Waschpuffer	Cellwash + 2% FCS	BD, Heidelberg, BRD
Cellwash	5 Tabletten PBS in 1l Ampuven	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNAse	Stammlösung: 1mg/ml PBS 5 min bei 100°C erhitzen	Serva, Heidelberg, BRD
Propidiumiodid	Stammlösung: 1mg/ml H ₂ O	Calbiochem, Darmstadt, BRD
Fixierlösung	70% Ethanol + 30%	

2 Material und Methoden

Ampuva

Ethanol

Roth, Karlsruhe, BRD

2.1.2.4 Apoptosedetektion

Kit

Annexin-V-Fluos Staining Annexin-V-Fluorescein
Kit Propidiumiodid
Inkubationspuffer

Roche, Mannheim, BRD

2.1.2.5 Western Blot-Analyse von Apoptose-Faktoren

Herstellung von Gesamtzelllysaten

Chemikalien und Lösungen

Lysispuffer mammalian 10mM TrisHCL
Cells

Roth, Karlsruhe, BRD

140mM NaCl

Merck, Darmstadt, BRD

3mM MgCl₂

Sigma-Aldrich, St. Louis,
USA

1% Triton x-100
in Ampuva: pH 8,0
und sterilfiltrieren
Lagerung bei 4°C

Bio Rad, Hercules, USA

NaF

420mg in 10ml Ampuva
Sterilfiltrieren, Lagerung bei
RT

Na₃VO₄-

0,9195g in 25ml Ampuva

Proteaseninhibitor- Cocktail

Set 1

Calbiochem, Darmstadt,
BRD

Lysis-Puffer

984µl Lysispuffer mammalian
cells
10µl Proteaseninhibitor-Cocktail
1µl NAF
5µl Na₃VO₄

je ml

2 Material und Methoden

BCA-Assay zur Proteinbestimmung

Geräte

Inkubator/Schüttler	Titramax 1000	Heidolph, Schwabach, BRD
Photometer ELISA	Multiscan ascert Reader	Thermo, Waltham, USA
ELISA-Software Magellan		Tecan, Grödig, AU

Verbrauchsmaterialien

Gewebekulturplatten	96well	Greiner bio-one, Frickenhausen, BRD
---------------------	--------	--

Kit

Bestimmung Proteingehalt	Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Rockford, USA
--------------------------	--------------------------------------	-----------------------

Protein-Extraktion durch Mitochondrien-Isolation

Geräte

Homogenisator	Schütt homogen ^{plus}	Schütt, Göttingen, BRD
EPPI-Pistillen		Schütt, Göttingen, BRD

Chemikalien und Lösungen

Mitochondrien- Isolationspuffer	20mM HEPES pH 7,4	Serva, Heidelberg/New York
	10mM KCl	
		Merck, Darmstadt, BRD
	1,5mM MgCl ₂	
	1mM sodium EDTA	Amersham, Little Chalfont, UK
	250mM sucrose	Roth, Karlsruhe, BRD
	1mM DTT	Sigma-Aldich, St. Louis, USA
	Proteaseninhibitor-Cocktail (10µl auf 1ml)	Calbiochem, Darmstadt, BRD

SDS-Page und Western Blot zur Bestimmung von Apoptose-regulierenden Faktoren

Geräte

2 Material und Methoden

Wärmeblock	Eppendorf, Hamburg, BRD
Gel Kammer	Bio Rad, Hercules, USA
Blotting Kammer	Bio Rad, Hercules, USA
Rollenschüttler	Heidolph, Schwabach, BRD

Gamma-Kamera	CHEMI DOC XRS	Bio Rad, Hercules, USA
--------------	---------------	------------------------

Verbrauchsmaterialien

Nitrozellulose- Membranen	Hybond ^{TM+}	Amersham, Little Chalfont, UK
Filterpapier		Amersham, Little Chalfont, UK

Chemikalien und Lösungen

Acrylamid/ Bisacrylamid	Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, BRD
Tris HCl		Roth, Karlsruhe, BRD
SDS		Serva, Heidelberg, BRD
APS	10% in H ₂ O	Merck, Darmstadt, BRD
TEMED		Roth, Karlsruhe, BRD
2-Mercaptoethanol		J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Bromphenolblau		Serva, Heidelberg, BRD
Tris		Serva, Heidelberg, BRD
Glycin		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween®20		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Proteinstandard	Protein-Marker prestained	IV Peqlab, Erlangen, BRD
dry milk		Roth, Karlsruhe, BRD
Ponceau-Rot		Serva, Heidelberg, BRD
Detektions-Kit	SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo, Waltham, USA
Trenngel 10%	4ml H ₂ O 3,3ml 30% Acrylamid	

2 Material und Methoden

	2,5ml 1,5M Tris pH9,2	
	0,1ml 10% SDS	
	0,1ml 10% APS	
	0,004ml TEMED	
Sammelgel	2,7ml H ₂ O	
	0,67ml 30% Acrylamid	
	0,5ml 1M Tris pH6,8	
	0,04ml 10% SDS	
	0,04ml 10% APS	
	0,004ml TEMED	
4x SDS-Sample Buffer (reducing)	2,5ml 1M Tris pH6,8	
	2ml 40%SDS	
	4ml Glycerol	
	0,5ml H ₂ O	
	1mg Bromphenolblau	
4x SDS-Elektrophorese Puffer (Lämmli-Puffer)	15,1g Tris base	
	72g Glycin	
	5g SDS ad 1l H ₂ O	
	→ gebrauchsfertige 1:4 mit H ₂ O verdünnen	
	Lösung:	
Semi-dry Blot buffer (Towbin-Puffer)	25mM Tris	
	192mM Glycin	
	20% Methanol → pH8,3	
Stripping buffer	62,5mM Tris HCl	
	100mM 2-Mercaptoethanol	
	2g SDS → pH6,7	
<u>Antikörper</u>		
anti-human Caspase 8	mouse IgG ₁ ; clone 3-1-9	BD, Heidelberg, BRD
anti-human Caspase 9	mouse IgG ₁ ; clone 22-2	BD, Heidelberg, BRD
anti-human Caspase 3	mouse IgG _{2a} ; clone 19/CPP32	BD, Heidelberg, BRD
anti-human Cytochrom C	mouse IgG _{2b} ; clone 7H8	BD, Heidelberg, BRD
anti-β-42-Aktin	mouse IgG _{2a}	Santa Cruz, USA
Sekundärkonjugat	anti-mouse 1:4000	Cell Signaling New England Biolabs, Hitchin,

UK

2.1.2.6 Analyse der NfκB-Aktivität

Herstellung von Gesamtzelllysaten

Siehe 2.1.2.4

BCA-Assay zur Proteinbestimmung

Siehe 2.1.2.4

ELISA NfκB-Aktivität

Geräte

Multipette

Eppendorf, Hamburg, BRD

Verbrauchsmaterialien

Multipettenspitzen

ritips®

Ritter, Schwabmünchen,
BRD

Kit

Detektion der NfκB-Aktivität

TransAM NfκB p65
Transcription Factor Assay
Kit

Activemotif, Rixensart,
Belgien

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kulturbedingungen

Die zwei humanen Ovarialkarzinom-Zelllinien SKOV-3 und BG1 werden bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Als Nährlösung wird RPMI 1640 eingesetzt, dem 10% fetales Kälberserum und je 1% Natrium-Pyruvat und Penicillin/ Streptomycin zugesetzt sind. Beide Zelllinien wachsen adhärent und werden mittels Trypsin-EDTA geerntet.

Die Zellen werden alle 1-2 Tage auf Wachstum und Kontamination mikroskopisch überprüft und nach maximal 4 Tagen unter Sterilwerkbänken mit vertikalem Luftstrom in neue Kulturgefäße überführt. Die Gewebekulturmedien werden bei 4°C gelagert und nur zum Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Beide Zelllinien werden erst nach

2 Material und Methoden

der zweiten Passage für Versuche verwendet und insgesamt maximal 14 Mal passagiert, um Veränderungen der Zelllinien mit zunehmender Kulturdauer vorzubeugen. Deshalb werden zu Beginn der Arbeit die Zellen in Einzelportionen zu circa $4\text{-}7 \times 10^6$ Zellen in Einfriermedium konserviert und bei -196°C im Stickstofftank gelagert.

2.2.1.2 Passagieren von Zellen

Bei ca. 90% konfluentem Wachstum werden die Zellen auf neue Kulturgefäße umgesetzt. Hierzu werden, nach Verwerfen des alten Mediums, jeweils 6,5ml Trypsin-EDTA zugegeben und die Zellen 10 Minuten (SKOV-3) und 20 Minuten (BG1) bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird durch Zugabe der gleichen Menge Medium das Trypsin neutralisiert, die Kulturflasche sorgfältig ausgespült und die Zellsuspension bei 250g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellpellets werden in 2ml Medium resuspendiert und die Zellen, je nach weiterem Verwendungszweck, entweder auf neue Gewebekulturflaschen mit 25ml Medium oder für die Durchführung der Versuche auf Gewebekulturplatten gesetzt.

2.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Um bei Bedarf frische Zellen zur Verfügung zu haben, werden zu Beginn der Arbeit von beiden Zelllinien Einzelportionen kryokonserviert. Wie beim Passagieren werden die Zellen zunächst geerntet und zentrifugiert, anschließend jedoch nicht in normalem Medium resuspendiert, sondern in eigens für die Kryokonservierung hergestelltem Einfriermedium (je 1ml), welches aus 10% DMSO und 90% FCS zusammengesetzt ist. Durch das lipophile DMSO wird die Bildung von Eiskristallen verhindert, welche die Zellmembran zerstören würden. Die Zellsuspensionen werden in 1,8ml Kryoröhrchen überführt und bei -196°C im Stickstofftank gelagert.

2.2.1.4 Reaktivierung kryokonservierter Zellen

Die Kryoröhrchen werden dem Stickstofftank entnommen, zur Mykoplasmen-Dekontamination mit Methanol abgewischt und unter der Sterilbank in Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von je 5ml eiskaltem Medium, werden die Zellsuspensionen bei 250g 10 Minuten zentrifugiert, in 2ml frischem Medium resuspendiert und auf große Gewebekulturflaschen mit 25ml Medium gesetzt.

2 Material und Methoden

2.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wird mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dazu werden 10µl der Zellsuspension mit 54µl PBS und 36µl Trypanblau 0,4% vermischt. Anschließend werden 10µl dieses Gemischs in die Neubauer-Zählkammer überführt, die Zellzahl pro Quadrat ermittelt und die Gesamtzellzahl nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellen/ ml} = \text{gezählte Zellen pro Quadrat} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Da das Volumen eines Quadrats 0,1µl entspricht, wird zur Umrechnung auf 1ml mit dem Faktor 10^4 multipliziert. Der Verdünnungsfaktor beträgt 1:10, sodass die ermittelte Zellzahl pro Kammer mit dem Faktor 10^5 multipliziert wird, um die tatsächliche Zellzahl in 1ml zu ermitteln.

2.2.2 Durchflusszytometrie

Zur Erfassung verschiedener Zellparameter (Volumen, Absorption etc.) einer hohen Anzahl von Zellen in möglichst kurzer Zeit eignet sich besonders gut die Durchflusszytometrie.

Nach hydrodynamischer Fokussierung passieren hierbei Zellen einzeln einen Laserstrahl. Zwei Linsen, rechtwinklig zueinander positioniert, sammeln das an der Zelloberfläche gestreute Licht und, nach Passage verschiedener Filter, wird dieses durch Photoröhren und -dioden in elektrische Impulse umgewandelt. Die Stärke der elektrischen Impulse ist proportional zu der Intensität der Lichtsignale. Das in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht (=Forward Scatter) ist proportional zur Zellgröße, während das orthogonal gestreute Licht (=Side Scatter) proportional zur Granularität der Zelle ist. Zusätzlich bietet die Durchflusszytometrie die Möglichkeit der Fluorochromierung. Dies ist die Darstellung bestimmter Strukturen mittels spezieller fluoreszierender Farbstoffe.

Für die durchflusszytometrischen Analysen in der vorliegenden Arbeit wird ein FACS-Calibur-Gerät verwendet. Dieses ist mit einem Argonlaser (488nm) und einer roten Laserdiode (633nm) ausgestattet und ermöglicht so die gleichzeitige Analyse von bis zu vier Farben. Ausgewertet werden die Daten mittels der Software *Cell Quest Pro*.

2.2.3 Zellzyklus-Analyse mit Propidiumiodid

Für die Zellzyklus-Analyse wird der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (=PI) verwendet, der ein Absorptionsmaximum bei 550nm und ein Emissionsmaximum bei 650nm besitzt. Aufgrund der stöchiometrischen Bindung von PI an doppelsträngige DNS ist es mittels Durchflusszytometrie möglich, die Zellen anhand der detektierten Fluoreszenzsignale den verschiedenen Phasen des Zellzyklus zuzuordnen. Dabei besitzen Zellen in der G0/G1-Phase einen diploiden, in der G2-Phase einen tetraploiden und in der S-Phase einen di- beziehungsweise tetraploiden Chromosomensatz. Sie senden so unterschiedlich stark fluoreszierende Signale aus. Nach Aktivierung des Apoptose-Programms durch Überführen der Caspase 3 in ihre aktive Form kommt es zur Fragmentierung der DNS. So enthalten Zellen in einem späteren Stadium der Apoptose weniger intakte DNS als Zellen in den Zellzyklus-Phasen G1 und G0 (=diploid). Diese stellen sich in der Zellzyklus-Analyse mit PI als Sub-G0/1-Peak (s. Abb. 7: M4) dar. Da sich in dieser Studie bei der Modulation der Zellzyklusphasen durch zytotoxische Substanzen kaum mehr eine eindeutige Grenze zwischen der S- und G2-Phase ziehen lässt, werden in der weiteren Analyse beide Phasen als S/G2-Phase zusammengefasst und mit M3 (Abb. 7) markiert.

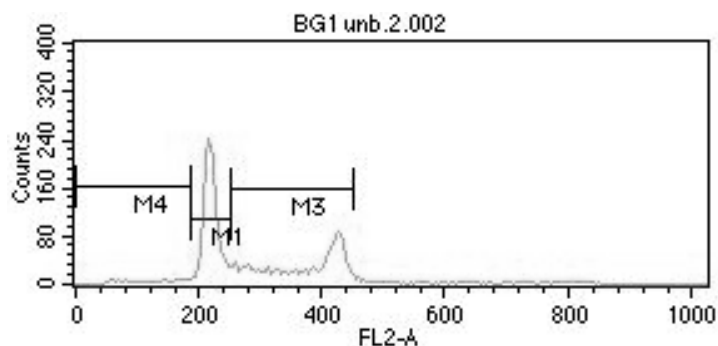


Abb. 7 Darstellung der Zellzyklusphasen nach Analyse mittels Durchflusszytometrie am Beispiel unbehandelter BG1-Zellen; M1= G0/1-Phase; M3= S/G2-Phase; M4= Sub-G0/1-Peak (Zelltrümmer).

Da PI jedoch neben doppelsträngiger DNS auch unspezifisch an doppelsträngige RNS bindet, ist es notwendig, die Zellen vor der FACS-Analyse mit RNase zu behandeln. So kann einer Verfälschung der Messergebnisse durch detektierte doppelsträngige RNS vorgebeugt werden.

2 Material und Methoden

2.2.3.1 Zellzyklusanalyse

Konzentrationsreihen

Zunächst wird untersucht, inwiefern die Substanzen Carboplatin, Flavopiridol, Bortezomib und MG-115 nach singulärer Applikation den Ablauf des Zellzyklus modulieren. Neben der Konzentrationsabhängigkeit wird auch eine mögliche Zeitabhängigkeit der Wirkung getestet. Dazu werden beide Zelllinien mit den vier Substanzen in steigender Konzentration versetzt und die Ergebnisse jeweils nach 24 und 48 Stunden dokumentiert. Die daraus resultierenden Konzentrationsreihen für die einzelnen Substanzen basieren auf zweimalig durchgeführten Versuchen und werden nicht statistisch ausgewertet. Sie geben einen Anhaltspunkt über die Wirkung der Substanzen auf beide Zelllinien in verschiedenen Konzentrationen und dienen als Basis für die nachfolgenden Versuche.

Anschließend werden von allen vier Substanzen jeweils zwei Konzentrationen für die nachfolgenden Kombinationsversuche ausgewählt. Nach Auswertung der Ergebnisse wird für alle weiteren Versuche entschieden eine Inkubationszeit von 24 Stunden einzuhalten.

Zellzyklusanalyse der Kombination von Flavopiridol, Bortezomib und MG-115 mit Carboplatin

Beide Zelllinien werden zu je 2×10^5 Zellen in 1ml Medium pro well in 6-well-Platten ausplattiert und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag werden in je 1ml Medium die Substanzen in den jeweiligen Konzentrationen (Tab. 1) und die Stocklösung (unbehandelte Kontrolle) hinzugegeben.

Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank werden die Zellen mit je 1ml Trypsin-EDTA von den Kulturplatten gelöst und mit der gleichen Menge Medium resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 250g für 10 Minuten werden die Zellen einmalig mit Cellwash gewaschen und mit 3ml eiskaltem 70%igem Ethanol fixiert. Bis zur Färbung werden die Proben bei 4°C für mindestens 2 Stunden gelagert.

SKOV-3	BG1
Carboplatin 10µM	Carboplatin 10µM
Carboplatin 50µM	Carboplatin 25µM
Flavopiridol 0,1µM	Flavopiridol 0,1µM
Flavopiridol 1µM	Flavopiridol 1µM
Bortezomib 0,005µM	Bortezomib 0,01µM
Bortezomib 0,01µM	Bortezomib 0,05µM
MG-115 0,5µM	MG-115 1µM
MG-115 1µM	MG-115 5µM
Carboplatin 10µM + Flavopiridol 0,1µM	Carboplatin 10µM + Flavopiridol 0,1µM
Carboplatin 50µM + Flavopiridol 1µM	Carboplatin 25µM + Flavopiridol 1µM
Carboplatin 10µM + Bortezomib 0,005µM	Carboplatin 10µM + Bortezomib 0,01µM
Carboplatin 50µM + Bortezomib 0,01µM	Carboplatin 25µM + Bortezomib 0,05µM
Carboplatin 10µM + MG-115 0,5µM	Carboplatin 10µM + MG-115 1µM
Carboplatin 50µM + MG-115 1µM	Carboplatin 25µM + MG-115 5µM

Tab. 1 Pipettierschema der Kombinationsversuche zur Zellzyklusanalyse und zum Apoptose-Verhalten; angegebene Endkonzentration im Kulturgefäß

Nach Zentrifugation der fixierten Zellen bei 400g und Raumtemperatur für 5 Minuten werden die Proben zweimal mit je 2ml Cellwash gewaschen. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen. Anschließend erfolgt die Behandlung mit je 100µl RNase und Inkubation bei 37°C im Wärmeschrank. Nach 30 Minuten werden jeweils 1ml Cellwash und 10µl PI-Stammlösung zugegeben. Erneut folgt die Inkubation für 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Die Proben werden mit dem FACS-Calibur gemessen und mittels der Cellquest Software analysiert. Erfasst werden jeweils 20.000 Zellen, wobei Forward Scatter linear und Side-Scatter sowie Fluoreszenzdaten logarithmisch registriert werden. Die graphische Darstellung von sechs gleichartig durchgeführten Experimenten erfolgt mit Microsoft® Excel. Zur statistischen Analyse der sechs Einzelwerte wird, unter Angabe der Mittelwerte und jeweiligen Standardabweichung, der Mann Whitney U-Rangsummentest herangezogen. Dabei werden Ergebnisse mit $\alpha < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

2.2.4 Bestimmung des Apoptose-Verhaltens (Annexin-V- und PI-Färbung)

Mittels der Annexin-V- und PI-Färbung kann zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen unterschieden werden (Abb. 8).

2 Material und Methoden

Die Zellen werden mit dem Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszin-konjugiertem Annexin-V angefärbt. Dieses detektiert Phosphatidylserine (=PS), die im frühen Stadium der Apoptose von der Innenseite der Zellmembran nach außen verlagert werden. Anschließend werden die Zellen mit PI, welches die DNS von nekrotischen Zellen anfärbt, gegen gefärbt und die Proben mit dem FACS-Calibur analysiert.

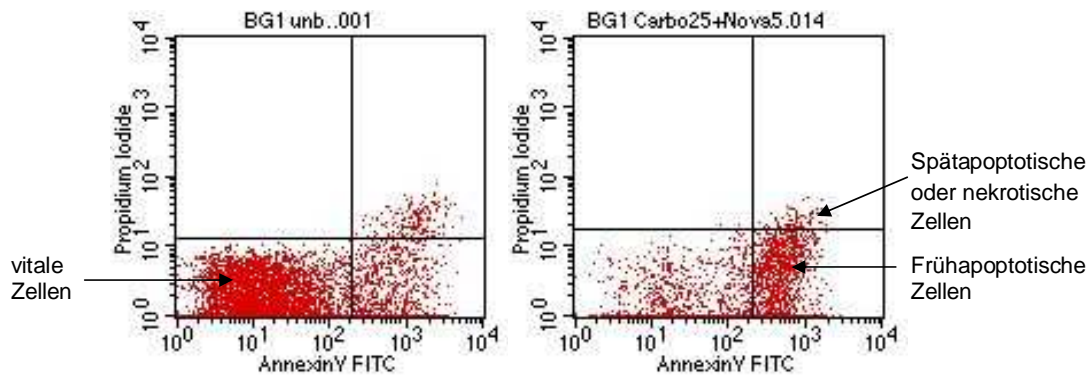


Abb. 8 Darstellung des Annexin-V-Assay nach Analyse mittels Durchflusszytometrie von unbehandelten BG1-Zellen (links) und Zellen, welche für 24 Stunden simultan mit 25 μl Carboplatin und 5 μl MG-115 inkubiert wurden (rechts). Die x-Achse entspricht der Anfärbung mit Annexin-V, die Y-Achse der Anfärbung mit Propidium-Iodid.

Die vier Quadranten entsprechen

links unten: Zellen, die sich weder mit Annexin noch mit PI anfärben = vitale Zellen

rechts unten: Zellen, die sich nur mit Annexin anfärben = apoptotische Zellen

links oben: Zellen, die sich nur mit PI anfärben = aufgelöste Zellen, spätes Stadium des Zelltods oder Nekrose

rechts oben: Zellen, die sich mit PI und Annexin anfärben = spätapoptotische/ nekrotische Zellen

Um falsch positive Ergebnisse (hoher Prozentsatz Annexin-V-angefärbter Zellen in der unbehandelten Kontrolle) zu vermeiden, sollen sich die Zellen in optimalem Zustand befinden. Es sollte auf eine besonders schonende Ernte der Zellen geachtet und bei der Färbung jede mechanische Beanspruchung der Zellen vermieden werden.

2.2.4.1 Zellkultur mit zytotoxischen Substanzen

Beide Zelllinien werden zu 2×10^5 Zellen in je 1ml Medium pro well in 6-well-Platten ausplattiert. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank werden anschließend die Substanzen in der jeweiligen Konzentration in 1ml Medium (Tab. 1) und bei der unbehandelten Kontrolle die Stocklösung zugegeben. Erneut werden die Platten für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Durch Behandlung mit zytotoxischen Substanzen kommt es in entsprechenden Konzentrationen früh zu Veränderungen beziehungsweise Verlust bestimmter Zelleigenschaften. So verlieren beispielsweise adhärente Zellen die Fähigkeit zur

2 Material und Methoden

Adhärenz und lösen sich vom Untergrund ab. Um auch solche bereits gelösten Zellen zu konservieren, werden vor der Ernte die Überstände der Kulturplatten abgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und bei 250g unter Raumtemperatur abzentrifugiert. Anschließend werden pro well 0,5ml Trypsin-EDTA zugegeben und die Platten bis zum vollständigen Ablösen aller Zellen bei 37°C im Brutschrank für 40-45 Minuten inkubiert. Nach mikroskopischer Überprüfung der vollständigen Ablösung wird das Trypsin mit je 1ml Medium neutralisiert, die Zellen geerntet und ebenfalls bei 250g (Raumtemperatur) für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgt das einmalige Waschen mit je 1ml PBS.

2.2.4.2 Annexin-V- und PI-Färbung

Die Überstände werden dekantiert, je 50µl working solution (1 Teil PI, 1 Teil Annexin-V, 48 Teile Inkubationspuffer) den Proben zugegeben und bei Raumtemperatur für 10-12 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Nach Zugabe von 200µl Inkubationspuffer zu allen Röhrchen erfolgt die Messung mit dem FACS-Calibur und Analyse mittels der Cellquest Software.

Es werden jeweils 10.000 Zellen erfasst, wobei Forward Scatter linear und Side-Scatter sowie Fluoreszenzdaten logarithmisch registriert werden. Anschließend werden jeweils die Mittelwerte der Ergebnisse von sechs gleichartig durchgeführten Experimenten mit Microsoft® Excel graphisch dargestellt. Zur statistischen Analyse der sechs Einzelwerte wird, unter Angabe der Mittelwerte und jeweiligen Standardabweichung, der Mann Whitney U-Rangsummentest herangezogen. Dabei werden Ergebnisse mit $\alpha < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

2.2.5 Western Blot zur Bestimmung von apoptoseregulierenden Faktoren

2.2.5.1 Prinzip der Western Blot Methode

Der Western Blot ist eine Methode zur Identifizierung und Analyse von Proteinen. Dazu wird zunächst ein Proteingemisch auf eine Trägermatrix, ein Polyacrylamid-Gel, aufgetragen. Ein an das Gel angeschlossenes elektrisches Feld trennt die Proteine im Gel entsprechend ihrer Größe und Ladung auf. Dabei wirkt das Gel wie ein Sieb; kleine Proteine wandern leichter und schneller durch die Maschen des Gels, während große Proteine zurück gehalten werden.

Anschließend erfolgt die Übertragung der aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran mittels eines senkrecht zum Gel angeschlossenen

elektrischen Feldes. Das Muster der Auftrennung bleibt dabei erhalten. Nun können die Proteinbanden mittels spezifischer Antikörper identifiziert werden.

Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der einzelnen Geltaschen werden die Membranen nach erfolgreicher Entwicklung mit Stripping-Lösung versetzt, um so bereits gebundene Antikörper zu lösen. Anschließend werden die Membranen mit einem standardisierten anti- β -Aktin-Antikörper inkubiert, der das massenhaft in humanen Zellen vorhandene zytoplasmatische β -Aktin bindet. So kann nach der Farbentwicklung das Ausmaß der gleichmäßigen Beladung einzelner Banden kontrolliert werden. Im Versuchsteil der Mitochondrienisolation sollten sich so bei sorgfältigem Arbeiten in der Zytosol-Fraktion deutliche Banden des zytoplasmatische β -Aktin zeigen, während man bei den mit Mitochondrien beladenen Membranen keine solche Banden erwartet.

2.2.5.2 Herstellung von Gesamtzelllysaten zur Analyse der Caspasen-Aktivität

Zellkultur

Von beiden Zelllinien werden in je 6ml Medium jeweils $3,5 \times 10^6$ Zellen (SKOV-3) und 6×10^6 Zellen (BG1) auf 36 mittlere Kulturflaschen ausplattiert und bei 37°C im Brutschrank für 24 Stunden inkubiert.

Am folgenden Tag werden Carboplatin, Flavopiridol und Bortezomib einzeln und jeweils in Kombination mit Carboplatin in je 2ml frischem Medium den entsprechenden Kulturflaschen zugesetzt. Den unbehandelten Kontrollen wird reines Medium zugegeben. Aufgrund des komplexen Versuchsansatzes wird auf die Verwendung von MG-115, dem wir als Analogon des Proteasomeninhibitors Bortezomib vergleichbare Effekte zuschreiben, verzichtet. Um bei möglichst vielen Zellen Apoptose zu induzieren, werden, verglichen mit den bisherigen Versuchen, deutlich höhere Konzentrationen der einzelnen Substanzen eingesetzt (Tab. 2+3).

Jeweils 12 mittlere Kulturflaschen werden für 8, 16 und 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

SKOV-3		
unbehandelte Kontrolle		
Carboplatin 25µM	Flavopiridol 1µM	Bortezomib 0,01µM
Carboplatin 50µM	Flavopiridol 5µM	Bortezomib 0,1µM
Carboplatin 75µM	Flavopiridol 10µM	Bortezomib 1µM
	Carboplatin 50µM + Flavopiridol 1µM	Carboplatin 50µM + Bortezomib 1µM

Tab. 2 Pipettierschema der SKOV-3-Zelllinie zur Herstellung von Gesamtzelllysaten, angegebene Endkonzentration im Kulturgefäß

BG1		
unbehandelte Kontrolle		
Carboplatin 25µM	Flavopiridol 1µM	Bortezomib 0,01µM
Carboplatin 50µM	Flavopiridol 5µM	Bortezomib 0,1µM
Carboplatin 75µM	Flavopiridol 10µM	Bortezomib 1µM
	Carboplatin 25µM + Flavopiridol 1µM	Carboplatin 50µM + Bortezomib 1µM

Tab. 3 Pipettierschema der BG1-Zelllinie zur Herstellung von Gesamtzelllysaten, angegebene Endkonzentration im Kulturgefäß

Durch Behandlung mit zytotoxischen Substanzen kommt es in entsprechenden Konzentrationen früh zu Veränderungen beziehungsweise Verlust bestimmter Zelleigenschaften. So verlieren adhärenzte Zellen die Fähigkeit zur Adhärenz und lösen sich vom Untergrund ab. Um auch solche bereits gelösten Zellen zu konservieren, werden vor der Ernte die Überstände der Kulturplatten abgenommen, in 15er Falcons überführt und bei 250g, Raumtemperatur abzentrifugiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von je 3ml Trypsin-EDTA zu allen Kulturflaschen und die Inkubation für 13 Minuten (SKOV-3) und 20 Minuten (BG1) im Brutschrank. Mit äquivalenter Menge Medium wird das Trypsin neutralisiert und die Kulturgefäße sorgfältig ausgespült, um den Zellverlust möglichst gering zu halten. Die Zellsuspensionen werden bei 250g für 10 Minuten zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Zellpellets mit je 5ml PBS gewaschen. Parallel wird mit der Neubauer-Zählkammer die in den einzelnen Proben enthaltene Zellzahl bestimmt (2.2.1.5) und diese für die folgende Zelllyse notiert. Erneut werden die Proben zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Zellpellets bis zur Lyse bei -80°C gelagert.

2 Material und Methoden

Zellyse

Zur Gewinnung und Aufreinigung von intrazellulären Proteinen werden Zellen lysiert und die im Überstand vorliegenden Proteine durch Zentrifugieren von überflüssigem Zellmaterial befreit. Frisch angesetzter Lysispuffer wird auf Eis vorgekühlt und anschließend je 50µl den Zellpellets zugegeben. Die Zellen werden im Lysispuffer vollständig resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann werden die Lysate bei 13.000rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert.

Zellkultur zur Mitochondrienisolation für die Analyse von Cytochrom C

Von SKOV-3- und BG1-Zellen werden je 36 große Kulturflaschen mit jeweils 4×10^6 Zellen (SKOV-3) und 8×10^6 Zellen (BG1) in 10ml Medium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am zweiten Tag erfolgt die Zugabe der zytotoxischen Substanzen in je 10ml Medium pro Kulturflasche nach folgendem Schema:

SKOV-3 (36GF*)	BG1 (36GF)
6GF unbehandelt	6GF unbehandelt
6GF Carboplatin 50µM	6GF Carboplatin 25µM
6GF Flavopiridol 1µM	6GF Flavopiridol 1µM
6GF Bortezomib 0,01µM	6GF Bortezomib 0,05µM
6GF Carboplatin 50µM + Flavopiridol 1µM	6GF Carboplatin 25µM + Flavopiridol 1µM
6GF Carboplatin 50µM + Bortezomib 0,01µM	6GF Carboplatin 25µM + Bortezomib 0,05µM

Tab. 4 Pipettierschema zur Mitochondrienisolation, angegebene Endkonzentration im Kulturgefäß

*GF= große Kulturflaschen

Der unbehandelten Kontrolle wird reines Medium zugegeben.

Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank erfolgt die Ernte der Zellen mittels Trypsin-EDTA nach dem Standardprotokoll. Anschließend werden die Zellsuspensionen mit je 5ml eiskaltem PBS gewaschen, für 10 Minuten bei 250g zentrifugiert und die Zellpellets bis zur Mitochondrien-Isolation im Kühlschrank gelagert.

2 Material und Methoden

Proteinextraktion durch Mitochondrien-Isolation

Die Zellpellets werden in 750µl Mitochondrien-Isolationspuffer resuspendiert und 20 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend werden die Zellsuspensionen auf Eis 30 Mal mit dem Homogenisator bei 600rpm homogenisiert und dann für 10 Minuten bei 1000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bei 12.000g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das alte Zellpellet wird verworfen.

Das sich neu abgesetzte Zellpellet wird als mitochondriale Fraktion weiterverarbeitet, der Überstand, das Zytosol, in ein separates Eppendorf-Gefäß überführt. Das Mitochondrienpellet wird mit 200µl Isolationspuffer gewaschen und zusammen mit der zytosolischen Fraktion erneut 30 Minuten bei 4°C und 12.000g zentrifugiert. Der Überstand des Mitochondrien-Pellets wird abgenommen und verworfen, das Zytosol bei -80°C gelagert. Anschließend werden die Mitochondrien-Pellets in 60µl Lysispuffer resuspendiert und 30 Minuten auf Eis gestellt. Nun werden die Mitochondrien-Lysate bei 13.000rpm für 10 Minuten zentrifugiert und ebenfalls bei -80°C gelagert.

BCA-Assay zur Bestimmung des Proteingehalts

Zur Quantifizierung des Proteingehalts einer Probe wird die Micro-BCA-Methode (Pierce) angewendet. Dies ist eine Erweiterung der Biuret-Methode mit dem Reagenz Bicinchoninsäure (=BCA). Dabei kommt es zunächst zur Komplexbildung von Proteinen mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} -Ionen des Komplexes werden zu Cu^{+} -Ionen reduziert. Diese können nun durch Komplexbildung mit BCA durch Absorptionsmessung bei 562nm mit dem ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)-Lesegerät detektiert werden. Die Stärke der Absorption ist proportional zur in der Probe enthaltenen Proteinkonzentration. Zur Erstellung der Standardkurve wird der Proteinstandard (Kälber-Serum-Albumin) in absteigender Konzentration von 160µg/ml bis 10µg/ml in eine 96-well-Platte pipettiert. Die Zelllysate werden im Verhältnis 1:80 mit PBS verdünnt. Es werden 150µl des BCA-Reagenz zu jeder Probe zugegeben, der Ansatz zwei Stunden bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert und anschließend die Extinktion bei 560nm (Referenz 690nm) gemessen. Der Versuch wird in Doppelbestimmung durchgeführt.

2.2.5.3 Präparation der Gele

Zur besseren Auftrennung von Proteinen der Größe 15-150kD werden 10%ige Gele (SDS-Anteil) verwendet. Diese Gele setzen sich aus zwei Komponenten zusammen: dabei werden im oberen Teil, dem Sammelgel, durch das Einsetzen von Kämmen Geltaschen gebildet, die den Ausgangspunkt für die Proteinwanderung bilden. Im

2 Material und Methoden

darunter gegossenen Trenngel erfolgt anschließend die Auftrennung der Proteine nach Ladung und Größe.

Zunächst wird das Trenngel möglichst luftblasenfrei in die Gelkammer gegossen. Diese wird vorher aus zwei Glasplatten mit einem Gummizug als Abdichtung montiert und mit zwei Klammern fixiert. Nach erfolgter Polymerisierung wird das Sammelgel vorsichtig auf das Trenngel gegossen und ebenfalls bis zu dessen Polymerisierung abgewartet.

2.2.5.4 Präparation der Proben

Von den Zelllysaten werden durch Verdünnung mit PBS 15µl Proben gleicher Proteinkonzentration hergestellt und diese mit je 5µl 4x SDS-Sample-Puffer + 10% Mercaptoethanol versetzt. Dabei werden zur Detektion der Caspasen 3, 8 und 9 je 40µg Protein aus den Gesamtzelllysaten verwendet, zur Detektion von Cytochrom C je 20µg des Mitochondrien-Lysates und 22,5µg des Zytosol-Lysates.

Anschließend werden die Proben für 5 Minuten im Thermoblock auf 95°C erhitzt, kurz im Kälteblock abgekühlt und dann vollständig in die entsprechenden Taschen des Polyacrylamid-Gels pipettiert. Mit dem verwendeten Standard zur Größenbestimmung der aufgegebenen Proteine wird ebenso verfahren.

2.2.5.5 SDS-Elektrophorese

Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgt in einem *Vertical Mini Gel Elektrophorese System* bei einer Stromstärke von 20mA. Hat die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht, wird es der Apparatur entnommen.

2.2.5.6 Blotting, Ponceau-Rot-Färbung und Blocken

Das Blotting wird nach der Semi-dry-Methode unmittelbar nach Beendigung der SDS-Page bei konstant 10V durchgeführt. Dazu werden eine zugeschnittene Nitrozellulose-Membran und das Gel für 30 Minuten in Towbin Blot Buffer (Semi-dry blot Buffer) äquilibriert. Anschließend werden beide zwischen mit Blot Buffer durchtränkten Filterpapieren auf der Blotting-Apparatur positioniert und für 45 Minuten an ein senkrecht zum Blot-Sandwich gerichtetes elektrisches Feld angeschlossen. Unmittelbar nach dem Blotten wird die Membran aus der Apparatur genommen und mit Ponceau-Rot eingefärbt. Damit wird der Proteintransfer vom Gel auf die Membran überprüft. Anschließend wird die Membran durch Abspülen mit H₂O von Farbstoffen befreit und eine Stunde bei Raumtemperatur in Blocking Puffer (5% dry milk in PBS) inkubiert.

2.2.5.7 Immunologische Färbung des Blots

Nach dreimaligem Waschen der Membran in PBS + 0,05% Tween®20 für je fünf Minuten können nun die Proteinbanden auf der Membran mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert werden. Dabei macht man sich das Antigen-Antikörper-Bindungs-Prinzip zunutze: ein antigenspezifischer Maus-Primärantikörper bindet an „sein“ Epitop auf dem Antigen in dem auf die Membran geblotteten Proteingemisch. An die Fc-Region des primären Antikörpers bindet wiederum in einem zweiten Schritt ein sekundärer Antikörper, der gegen Maus-Antigene gerichtet ist und Peroxidase gekoppelt ist. Die Peroxidase katalysiert nach Zugabe von Peroxidase-Substrat (im Detektions-Kit enthalten) die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser. Das entstehende Produkt zerfällt sogleich wieder und sendet Lichtreflexe aus, die mit der Gamma-Kamera detektiert werden können. Die Primärantikörper werden in 2% dry milk in PBS gelöst und die Membranen für 20 Stunden bei 4°C auf dem Rollenschüttler inkubiert.

Antikörper	Konzentration
anti-Caspase 3	1µg/ml
anti-Caspase 8	0,5µg/ml
anti-Caspase 9	1-5µg/ml
anti-Cytochrom C	1µg/ml

Tab. 5 Pipettierschema der im Western Blot eingesetzten Primärantikörper (in 2% dry milk in PBS gelöst)

Nach erneut dreimaligem Waschen in PBS + 0,05% Tween®20 folgt die einstündige Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1:2000 in 2% dry milk in PBS). Nach dreimaligem Waschen für je 15 Minuten wird die Membran mit der Entwickler-Lösung aus dem *SuperSignal West Pico Chemiluminescence Kit* bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgt die Farbentwicklung mit dem CHEMI DOC XRS der Firma Bio Rad für 20-40 Minuten.

2.2.5.8 Stripping

Durch das Stripping werden bereits einmal gebundene Antikörper wieder von der Membran gelöst, um so die Inkubation mit anderen Primär- und Sekundärantikörpern zu ermöglichen. Dazu wird die Membran für 20 Minuten bei 65°C in 10ml Stripping-

2 Material und Methoden

Lösung inkubiert und kann anschließend mit einem anderen Detektionsantikörper erneut verwendet werden.

2.2.6 Analyse der NfκB-Aktivität

2.2.6.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten

Zellkultur mit zytotoxischen Substanzen

Von den beiden Zelllinien werden in je 7ml Medium jeweils 2×10^6 Zellen auf acht mittlere Kulturflaschen ausplattiert und diese bei 37°C im Brutschrank für 24 Stunden inkubiert. Am folgenden Tag werden die Substanzen einzeln und in Kombination mit Carboplatin in je 7ml Medium den entsprechenden Kulturflaschen zugesetzt (Tab. 6). Den unbehandelten Kontrollen wird reines Medium zugegeben.

SKOV-3	BG1
unbehandelt	unbehandelt
Carboplatin 10μM	Carboplatin 5μM
Flavopiridol 0,1μM	Flavopiridol 0,01μM
Bortezomib 0,001μM	Bortezomib 0,001μM
MG-115 0,5μM	MG-115 0,1μM
Carboplatin 10μM + Flavopiridol 0,1μM	Carboplatin 5μM + Flavopiridol 0,01μM
Carboplatin 10μM + Bortezomib 0,001μM	Carboplatin 5μM + Bortezomib 0,001μM
Carboplatin 10μM + MG-115 0,5μM	Carboplatin 5μM + MG-115 0,1μM

Tab. 6 Pipettierschema der Kombinationsversuche zur Analyse der NFκB-Aktivität; angegebene Endkonzentration im Kulturgefäß

Die Kulturplatten werden für 20 Stunden im Brutschrank inkubiert und dann die Überstände aus allen Kulturflaschen abgenommen, in 15er Falcons gesammelt, zentrifugiert und verworfen. Anschließend erfolgt die Zugabe von je 3ml Trypsin-EDTA zu allen Kulturflaschen und die Inkubation im Brutschrank für 13 Minuten (SKOV-3) und 20 Minuten (BG1) bis zur vollständigen Ablösung der Zellen vom Kulturgefäß. Das Trypsin wird mit der gleichen Menge Medium neutralisiert und die Kulturgefäße sorgfältig ausgespült, um den Zellverlust möglichst gering zu halten. Die Zellsuspensionen werden bei 250g für 10 Minuten zentrifugiert, die Überstände verworfen und mit je 5ml PBS gewaschen. Erneut werden die Proben zentrifugiert, die Überstände verworfen und diesmal in 1ml PBS resuspendiert. Diese Suspensionen werden in vorbereitete Eppendorf-Gefäße überführt und für 5 Minuten bei 2000rpm

2 Material und Methoden

zentrifugiert. Parallel wird mit der Neubauer-Zählkammer die in den einzelnen Proben enthaltene Zellzahl bestimmt und diese für die folgende Zelllyse protokolliert. Die Überstände in den Eppendorfgefäßen werden vorsichtig abgenommen und die zurückbleibenden Zellpellets bis zur Lyse bei -20°C gelagert.

Zelllyse

Zur Gewinnung und Aufreinigung von intrazellulären Proteinen werden Zellen lysiert und die im Überstand vorliegenden Proteine durch Zentrifugieren von überflüssigem Zellmaterial befreit. Frisch angesetzter Lysispuffer wird auf Eis vorgekühlt und die bei -20°C gelagerten Zellpellets bereitgestellt. Anschließend werden den Zellpellets pro 1×10^6 Zellen 100 µl des Lysispuffers zugegeben. Die jeweils enthaltene Zellzahl der Proben ist dem Protokoll der Zellkultur zu entnehmen. Die Zellen werden im Lysispuffer vollständig resuspendiert und 30 Minuten auf Eis gelagert. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 13.000rpm und 4°C, werden die Überstände vorsichtig in frische Eppendorf-Gefäße überführt und erneut zentrifugiert. Die Überstände werden abgenommen, für weitere Versuche zu je 10 µl aliquottiert und bei -20°C gelagert.

BCA-Assay zur Bestimmung des Proteingehalts

Um den Proteingehalt der Lysate zu bestimmen wird der BCA-Assay nach dem Standardprotokoll durchgeführt.

2.2.6.2 ELISA zur Quantifizierung der NFκB-Aktivität

Um den Einfluss von Carboplatin, Flavopiridol, Bortezomib und MG-115 auf die NFκB-Aktivität zu untersuchen, wird das *TransAM NF-κB Family Kit* verwendet. Die Methode basiert auf dem Prinzip des Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Abb. 9).

Das Kit enthält in den wells einer 96-well-Reaktionsplatte immobilisierte Oligonukleotide des NFκB-p65-Bindemotivs, an deren DNS-Sequenz die aktive Form der p65 Untereinheit von NFκB, die in den Zellextrakten enthalten ist, binden kann. An diese gebundenen NFκB-Untereinheiten andockende spezifische anti-p65-Antikörper werden wiederum von Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern gebunden, welche photometrisch detektiert werden können. Der Versuch erfolgt jeweils in Doppelbestimmung und die Durchführung nach den Vorgaben des Herstellers mit den im Kit enthaltenen Reagenzien. Die jeweiligen Zellextrakte werden in dem im Kit enthaltenen Lysispuffer in einer Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt, das Kontrolllysat mit 1 µg/ml. Anschließend werden die Ansätze zusammen mit je 30 µl eines Bindepuffers in die wells der 96-er Platte pipettiert und für eine Stunde bei

2 Material und Methoden

Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 200µl Waschpuffer werden zu jedem Ansatz 100µl des NFκB-p65-Antikörpers in einer 1:1000-Verdünnung zugegeben und es folgt eine Stunde Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend werden die wells erneut dreimal mit je 200µl Waschpuffer gewaschen und je 100µl des Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpers in einer Verdünnung von 1:2000 zugegeben. Erneut wird eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Platte mit je 200µl Waschpuffer viermal gewaschen wird. Nach Zugabe von je 100µl Entwicklerlösung wird die Entwicklung nach 2-2½ Minuten mit der gleichen Menge Stop-Lösung unterbrochen und es folgt die Analyse der NFκB-Aktivität mit dem ELISA-Plattenleser. Die Werte für die relative Änderung der NFκB-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beziehungsweise der Kombinationsansätze im Vergleich zu den jeweiligen Einzelsubstanzen werden statistisch mit dem Mann Whitney U-Rangsummentest ausgewertet und graphisch mit Microsoft® Excel dargestellt.

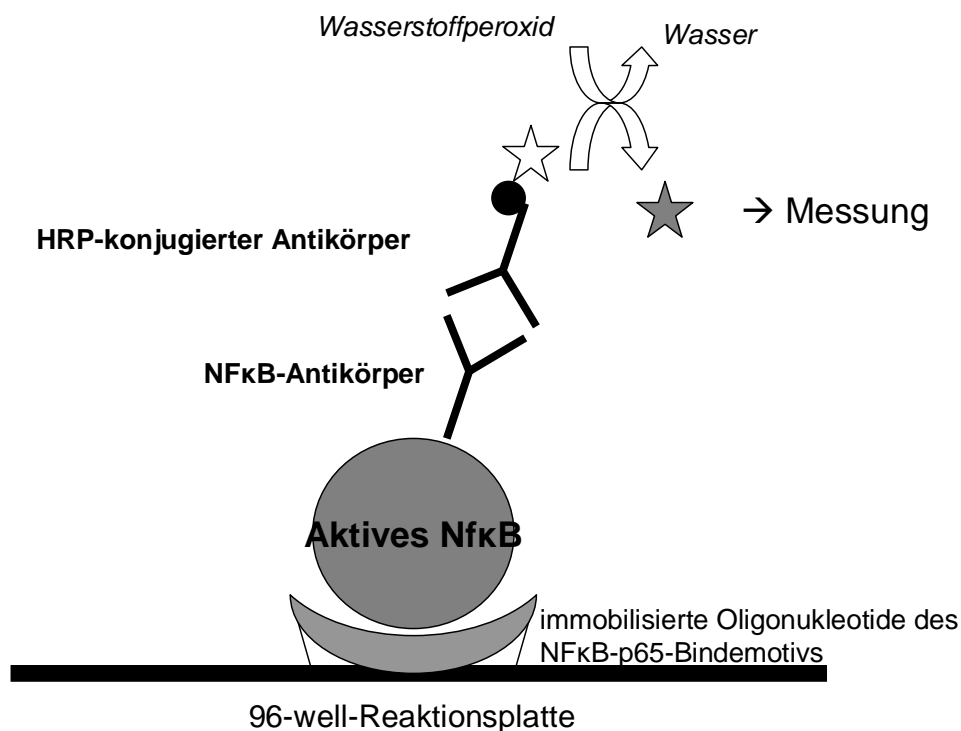


Abb. 9 Prinzip des Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Dabei wird das aktive NfκB-Protein an eine Mikrotiterplatte gebunden. Daran spezifisch andockende Antikörper werden wiederum von Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern gebunden, welche photometrisch detektiert werden können.

3 Ergebnisse

3.1 Modulation des Zellzyklus

3.1.1 Konzentrationsreihen

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Zuordnung von Zellen zu einzelnen Zellzyklusphasen. Dadurch ist es möglich Störungen der Zellteilung zu registrieren. Die Verteilung der Zellen an den einzelnen Zellzyklusphasen ist in Säulendiagrammen dargestellt. Die Prozentzahlen beziehen sich auf den Anteil an den verschiedenen Phasen von insgesamt 100% registrierter Zellen. Die Anteile müssen addiert nicht 100% erreichen, da nicht jede detektierte Zelle eindeutig einer Zellzyklusphase zugeordnet werden kann. Wie bereits erwähnt ist der Übergang von der S- zur G2-Phase in vielen Fällen nicht eindeutig festzulegen. Deshalb werden für die weiteren Analysen beide Phasen zusammen als S/G2-Phase ausgewertet. Die Zuordnung der Zellen zu den einzelnen Zellzyklusphasen nach Inkubation mit den vier Medikamenten zeigt bei beiden Zelllinien sowohl eine Zeit- als auch Konzentrationsabhängigkeit.

Beide Zelllinien zeigen deutliche Veränderungen des Zellzyklus nach 24-stündiger Inkubation mit Carboplatin in ansteigender Konzentration (Abb 10+11):

- Zunahme des Anteils an der S/G2-Phase unter simultaner Verminderung der Fluoreszenz jener Zellen, die sich in der G0/1-Phase befinden
- BG1: deutliche Zunahme der apoptotischen/ nekrotischen Fraktion (Sub-G0/1-Peak).

Für alle folgenden Versuchsansätze der BG1-Zelllinie wurde deshalb eine, verglichen mit den SKOV-3-Zellen, niedrigere Carboplatin-Konzentrationen gewählt.

3 Ergebnisse

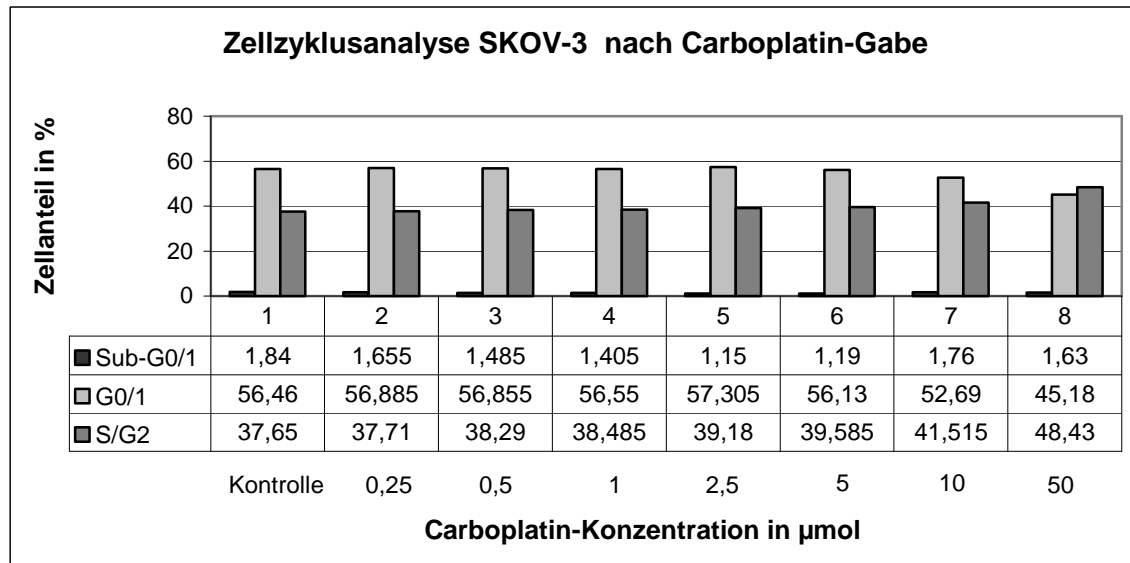


Abb. 10 Modulation des Zellzyklus bei den SKOV-3-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Carboplatin in ansteigender Konzentration; Zellzyklusmessung mittels Durchflusszytometrie (FACS= Fluorescence Activated Cell Sorting) nach Anfärbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI); in der Tabelle aufgeführt die prozentualen Anteile der Zellpopulation an der jeweiligen Zellzyklusphase.

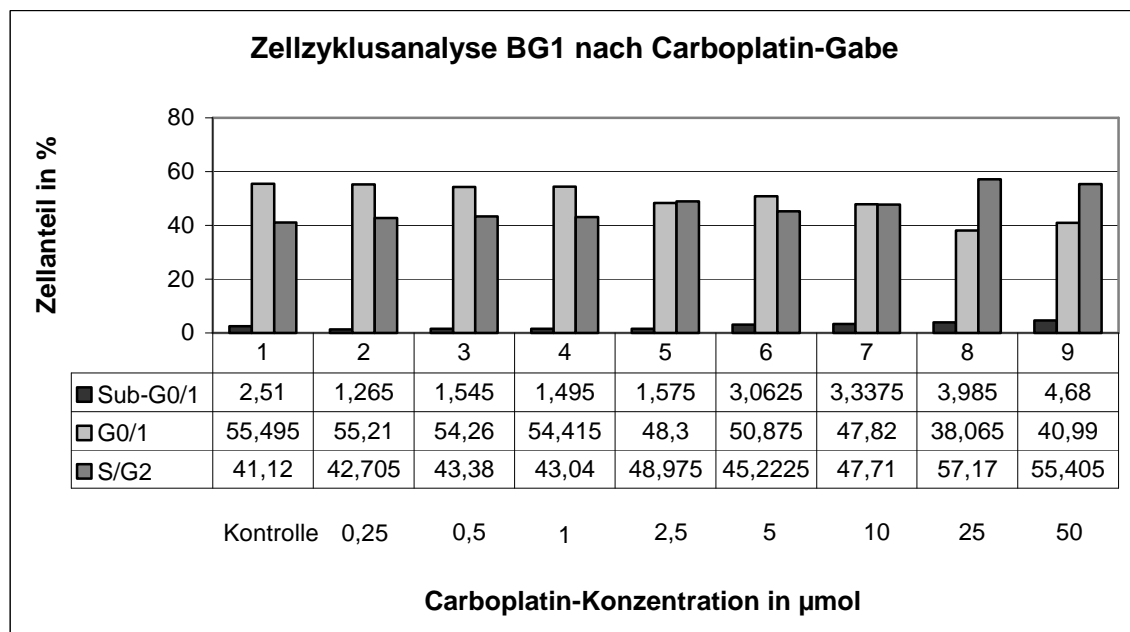


Abb. 11 konzentrationsabhängige Modulation des Zellzyklus bei den BG1-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Carboplatin; Zellzyklusmessung mittels Durchflusszytometrie (FACS= Fluorescence Activated Cell Sorting) nach Propidiumiodidanfärbung (PI); in der Tabelle aufgeführt die prozentuale Verteilung der Zellpopulation an der jeweiligen Zellzyklusphase.

Auch nach 24-stündiger Inkubation mit Flavopiridol in ansteigender Konzentration zeigen beide Zelllinien deutliche Veränderungen der Zellzyklusphasenverteilung:

- Abnahme der G0/1-Zellfraktion
- SKOV-3: Zunahme des Anteils an der S/G2-Phase (Abb.12)
- BG1: Zunahme der apoptotischen Zellfraktion (Sub-G0/1-Peak) (Abb. 13).

3 Ergebnisse

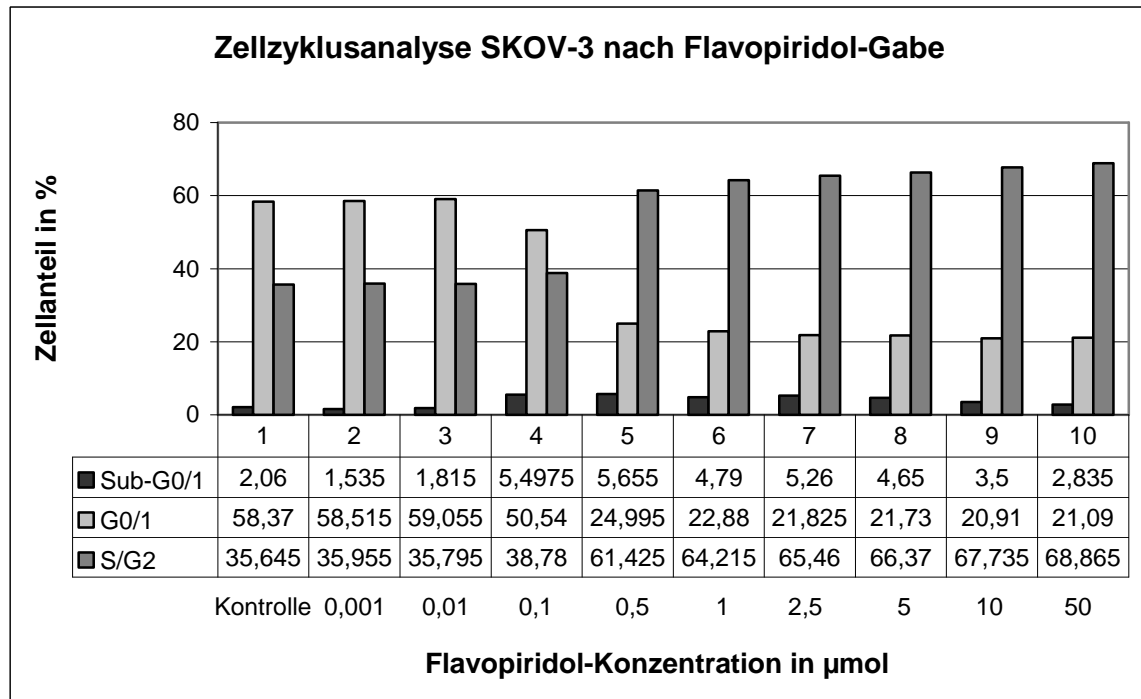


Abb. 12 Modulation der Zellzyklusphasen bei den SKOV-3-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Flavopiridol in ansteigender Konzentration. Zellzyklusmessung mittels Durchflusszytometrie (FACS= Fluorescence Activated Cell Sorting) nach Propidiumiodidanfärbung (PI); in der Tabelle aufgeführt die prozentuale Verteilung der Zellpopulation an den jeweiligen Zellzyklusphasen.

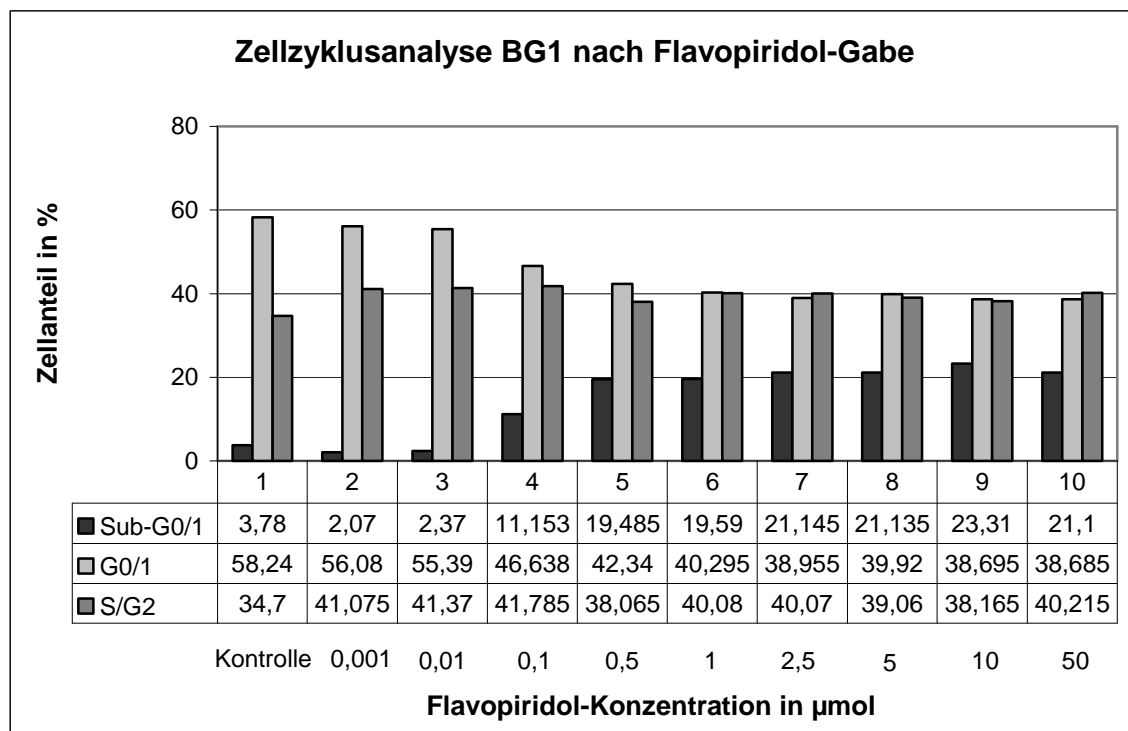


Abb. 13 Modulation der Zellzyklusphasen bei den BG1-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Flavopiridol in ansteigender Konzentration. Zellzyklusmessung mittels Durchflusszytometrie (FACS= Fluorescence Activated Cell Sorting) nach Anfärbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI); in der Tabelle aufgeführt die prozentualen Anteile an den jeweiligen Zellzyklusphasen.

3 Ergebnisse

Ebenso zeigen beide Zelllinien deutliche Veränderungen des Zellzyklus nach 24-stündiger Inkubation mit Bortezomib und MG-115 in ansteigender Konzentration (Abb. 14-17):

- Zunächst Abnahme des G0/1-Zellanteils mit simultanem Zellzyklusarrest in der S/G2-Phase
- Bei weiter steigender Konzentration schließlich Abschwächung dieses Effekts und Akkumulation von Zelltrümmern (Sub-G0/1)

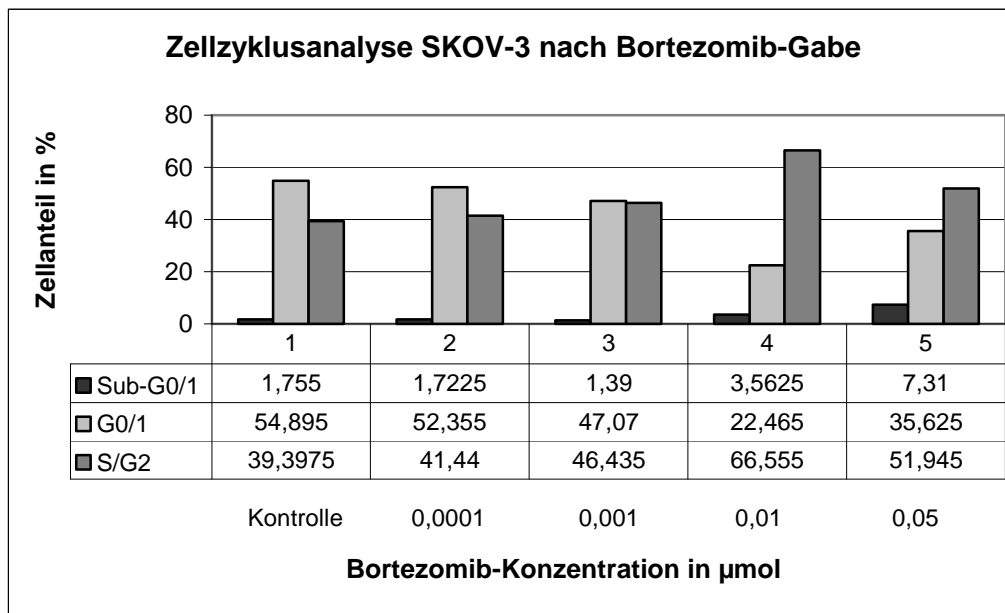


Abb. 14 Modulation der Zellzyklusphasen bei den SKOV-3-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Bortezomib in ansteigender Konzentration. Zellzyklusmessung mittels Durchflusszytometrie (FACS= Fluorescence Activated Cell Sorting) nach Anfärbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI); in der Tabelle aufgeführt die prozentualen Anteile an den jeweiligen Zellzyklusphasen.

3 Ergebnisse

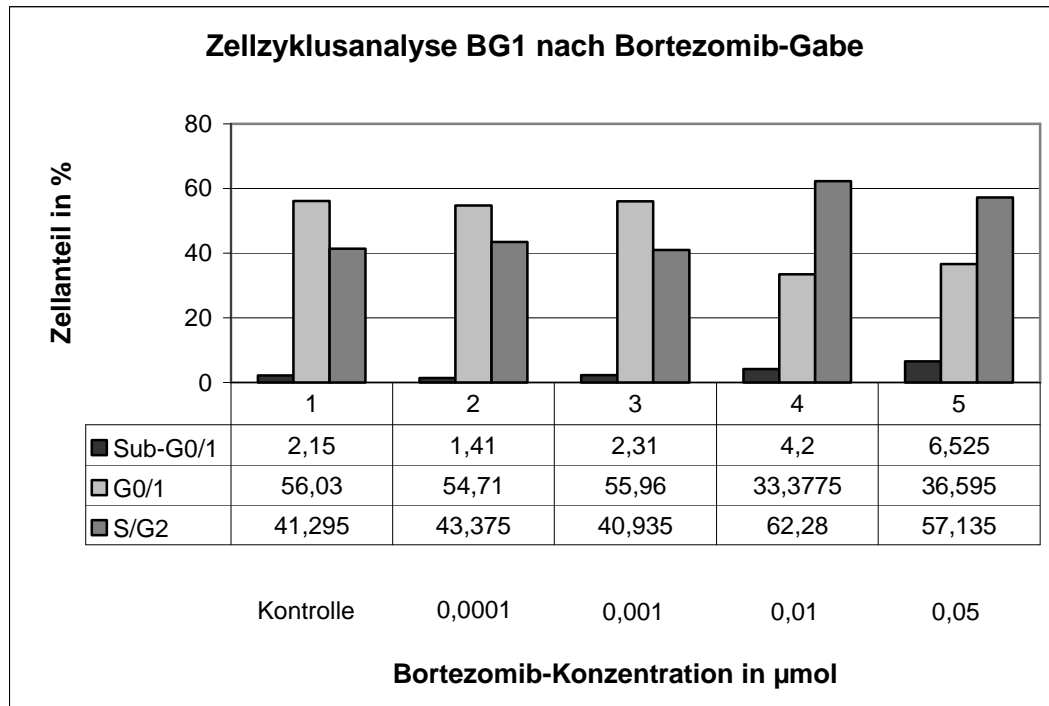


Abb. 15 Modulation der Zellzyklusphasen bei den BG1-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Bortezomib in ansteigender Konzentration. Zellzyklusmessung mittels Durchflusszytometrie (FACS= Fluorescence Activated Cell Sorting) nach Anfärbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI); in der Tabelle aufgeführt die prozentualen Anteile an den jeweiligen Zellzyklusphasen.

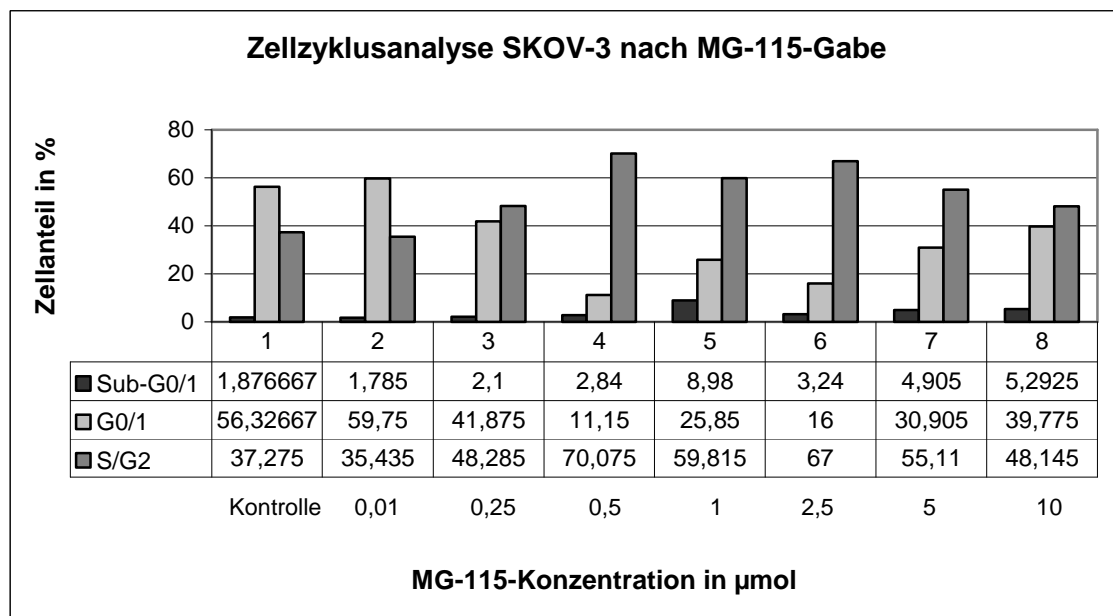


Abb. 16 Modulation der Zellzyklusphasen bei den SKOV-3-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit MG-115 in ansteigender Konzentration. Zellzyklusmessung mittels Durchflusszytometrie (FACS= Fluorescence Activated Cell Sorting) nach Anfärbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI); in der Tabelle aufgeführt die prozentualen Anteile an den jeweiligen Zellzyklusphasen.

3 Ergebnisse

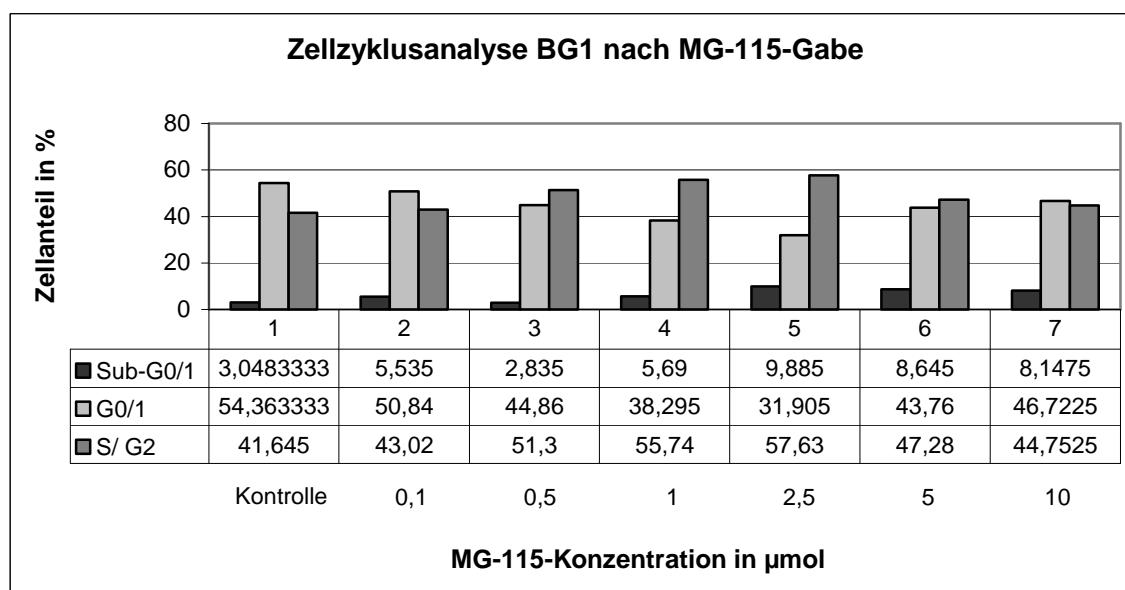


Abb. 17 Modulation der Zellzyklusphasen bei den BG1-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit MG-115 in ansteigender Konzentration. Zellzyklusmessung mittels Durchflusszytometrie (FACS= Fluorescence Activated Cell Sorting) nach Anfärbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI); in der Tabelle aufgeführt die prozentualen Anteile an den jeweiligen Zellzyklusphasen.

Nach 48-stündiger Inkubation beider Zelllinien mit den zytotoxischen Substanzen zeigen sich die Anteile der Zellfraktionen an der G0/1- und S/G2-Phase fast unverändert. Jedoch nimmt hier der Anteil an Zelltrümmern bei einigen Ansätzen Werte von weit über 20% der Gesamtzellzahl an. Eine Aussage über Veränderungen an der Zellverteilung an den einzelnen Zellzyklusphasen ist dann nur noch eingeschränkt möglich. Basierend auf dieser Beobachtung wurde für die folgenden Kombinationsversuche von Flavopiridol, Bortezomib und MG-115 mit Carboplatin deshalb eine Inkubationsdauer von 24 Stunden gewählt. Von den vier Substanzen wurden jeweils zwei Konzentrationen für die nachfolgenden Kombinationsversuche ausgewählt. Hierbei zeigen sich bei der niedrigeren Dosierung nach singulärer Applikation erste minimal modulierende Effekte auf den Zellzyklus. In der jeweils höheren Konzentration kommt es schließlich zu deutlichen Veränderungen der Zellverteilung an den einzelnen Zellzyklusphasen, jedoch ohne zu hohen Anteil von Zelltrümmern (Sub-G0/1-Peak).

Zum Pipettierschema der Kombinationsversuche siehe Tab. 1 (S. 34).

3.1.2 Zellzyklusanalyse nach Kombination von Flavopiridol, Bortezomib und MG-115 mit Carboplatin

Auch hier sind die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse durch eine Konzentrationsabhängigkeit bei der Modulation des Zellzyklus gekennzeichnet. Dabei wurden Flavopiridol, Bortezomib und MG-115 jeweils parallel zur Kombination mit

3 Ergebnisse

Carboplatin auch als Reinsubstanz appliziert. Die Ergebnisse basieren auf sechsfach durchgeführten Versuchen und wurden mit dem Mann Whitney U-Rangsummentest statistisch ausgewertet.

Wie schon die Konzentrationsreihe von Carboplatin zeigte, führt das Platinderivat nach 24-stündiger Inkubation zur Abnahme der G0/1-Zellfraktion mit simultanem Anstieg des Zellanteils an der S/G2-Phase. Dies ist bei dem 10µmolaren Ansatz der SKOV-3-Zellen statistisch noch nicht signifikant. Die quantitative Analyse der Daten bei den mit 50µmol inkubierten SKOV-3-Zellen und beiden BG1-Ansätzen zeigt hingegen eine mit steigender Carboplatin-Konzentration signifikante relative Zunahme dieser Zellfraktion um 32,1% (SKOV-3; 50µM) und 14,7% (BG1; 10µM) beziehungsweise 24,5% (BG1; 25µM), jeweils im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe. Eine Zunahme der Apoptoserate (Sub-G0/1) ist unter Carboplatin bei beiden Zelllinien nicht zu beobachten (siehe Abb.18 + 19).

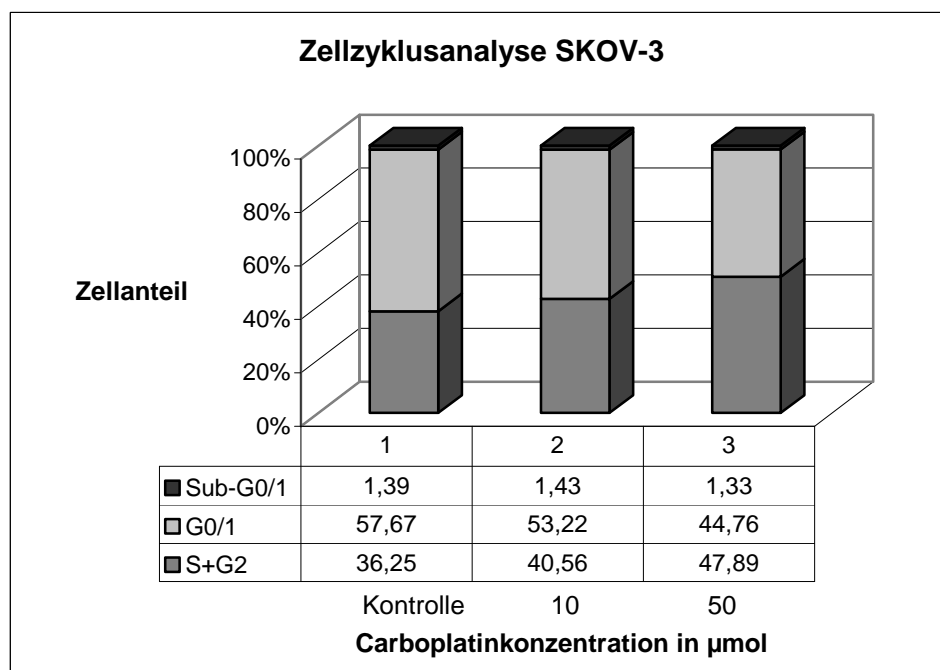


Abb. 18 Modulation der Zellzyklusphasen nach 24-stündiger Inkubation mit Carboplatin in ansteigender Konzentration bei den Skov-3-Zellen. Zellzyklusmessung mittels Durchflusszytometrie (FACS= Fluorescence Activated Cell Sorting) nach Anfärbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI); in der Tabelle aufgeführt die prozentualen Anteile an den jeweiligen Zellzyklusphasen.

3 Ergebnisse

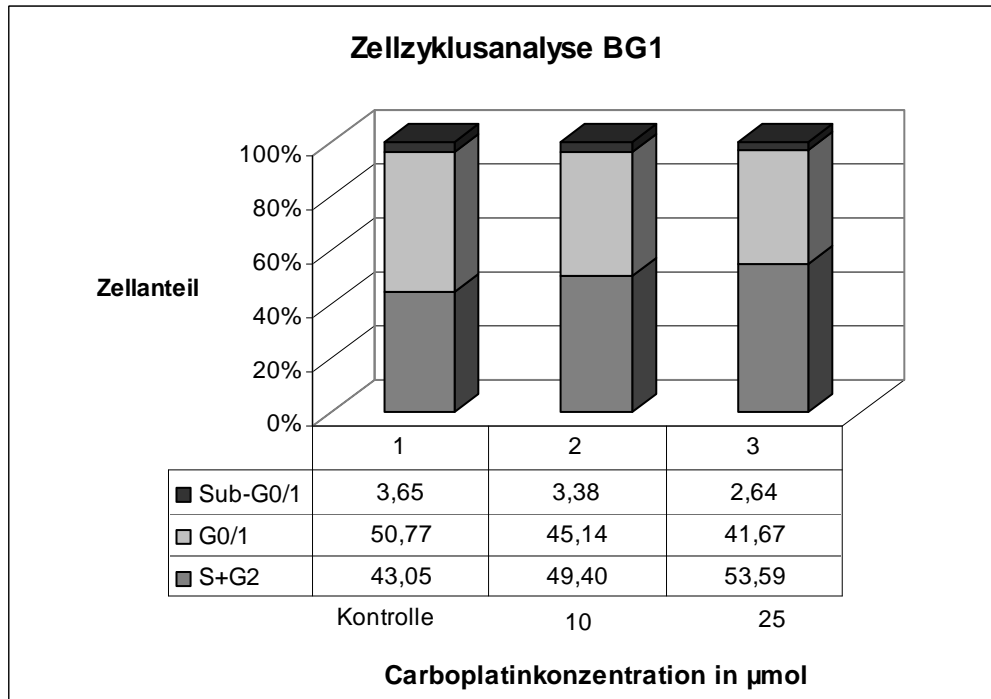


Abb. 19 Modulation der Zellzyklusphasen nach 24-stündiger Inkubation mit Carboplatin in ansteigender Konzentration bei den BG1-Zellen. Zellzyklusmessung mittels Durchflusszytometrie (FACS= Fluorescence Activated Cell Sorting) nach Anfärbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI); in der Tabelle aufgeführt die prozentualen Anteile an den jeweiligen Zellzyklusphasen.

Die Resultate der Flavopiridol-Konzentrationsreihe lassen sich für die BG1-Zellen mit statistischer Signifikanz reproduzieren. Die beobachteten Veränderungen der SKOV-3-Zelllinie hingegen halten der statistischen Auswertung nur teilweise Stand. Während es bei diesen nach Inkubation mit 0,1µmol Flavopiridol zu keiner signifikanten Modulation der Zellzyklus-Phasen kommt, steigt bei beiden Zelllinien die Zahl apoptotischer/ nekrotischer Zellen (Sub-G0/1) signifikant an (Abb. 20). Dabei liegt bei den BG1-Zellen der Anteil am Sub-G0/1-Peak im 1µmolaren Flavopiridol-Ansatz bei 13,4%, vergleiche SKOV-3-Zellen bei äquivalenter Dosierung 6,3%.

Während es nach Inkubation mit 1µmol/l Flavopiridol bei den SKOV-3-Zellen der in der Konzentrationsreihe dokumentierte Arrest in der S/G2-Phase nicht signifikant nachweisbar ist und lediglich der Zellanteil an der G0/1-Phase sinkt, wächst bei den BG1-Zellen mit steigender Konzentration lediglich die avitale Zellfraktion auf über 13%. Auch hier lässt sich, analog zur Konzentrationsreihe, in der ausgewählten Dosierung keine Zellzyklusarrest nachweisen.

3 Ergebnisse

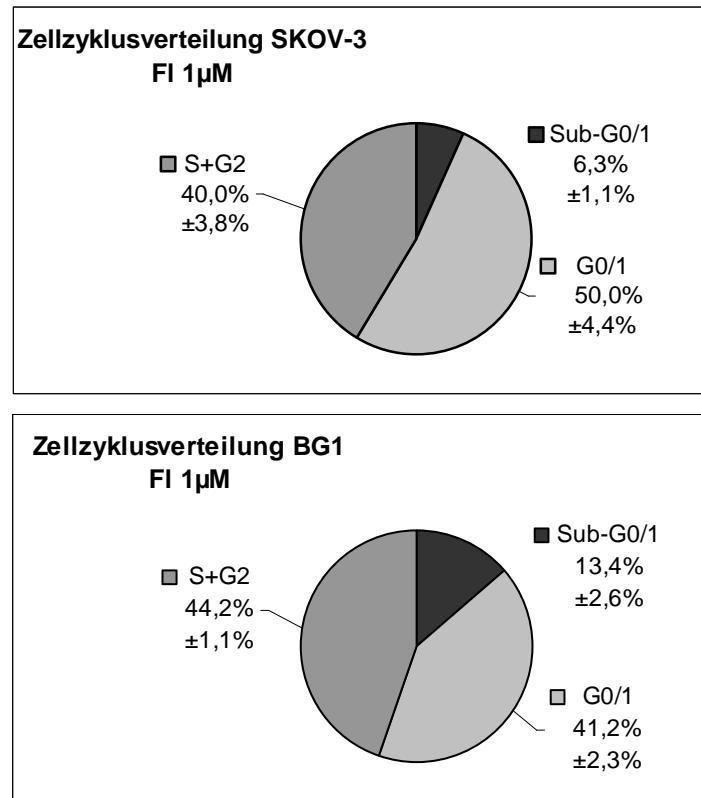


Abb. 20 direkter Vergleich beider Zelllinien nach Inkubation mit 1µmol Flavopiridol (=FI) für 24 Stunden: SKOV-3 oben, BG1 unten; Kreisdigramme mit prozentualer Verteilung der Zellen an den einzelnen Zellzyklusphasen mit zugehöriger Standardabweichung.

Analog zur Konzentrationsreihe reagieren beide Zelllinien auf die Inkubation mit dem Proteasomeninhibitor Bortezomib zunächst mit einem Zellzyklusarrest in der S/G2-Phase und simultaner Verminderung der Fluoreszenz jener Zellen, die sich in der G0/1-Phase befinden (Abb. 21). Dabei nimmt die Zellzahl in der S/G2-Phase bei den SKOV-3-Zellen im ersten Ansatz (0,005µM) um relativ 83,1%, bei den BG1-Zellen um 49,4% zu.

Die Ergebnisse des zweiten, jeweils höher konzentrierten Ansatzes zeigen eine Tendenz zur Abschwächung dieses Effekts. Der Zellanteil an der S/G2-Phase sinkt um über 20% bei beiden Zelllinien und es kommt zur signifikanten Akkumulation von Zelltrümmern (Sub-G0/1-Peak).

3 Ergebnisse

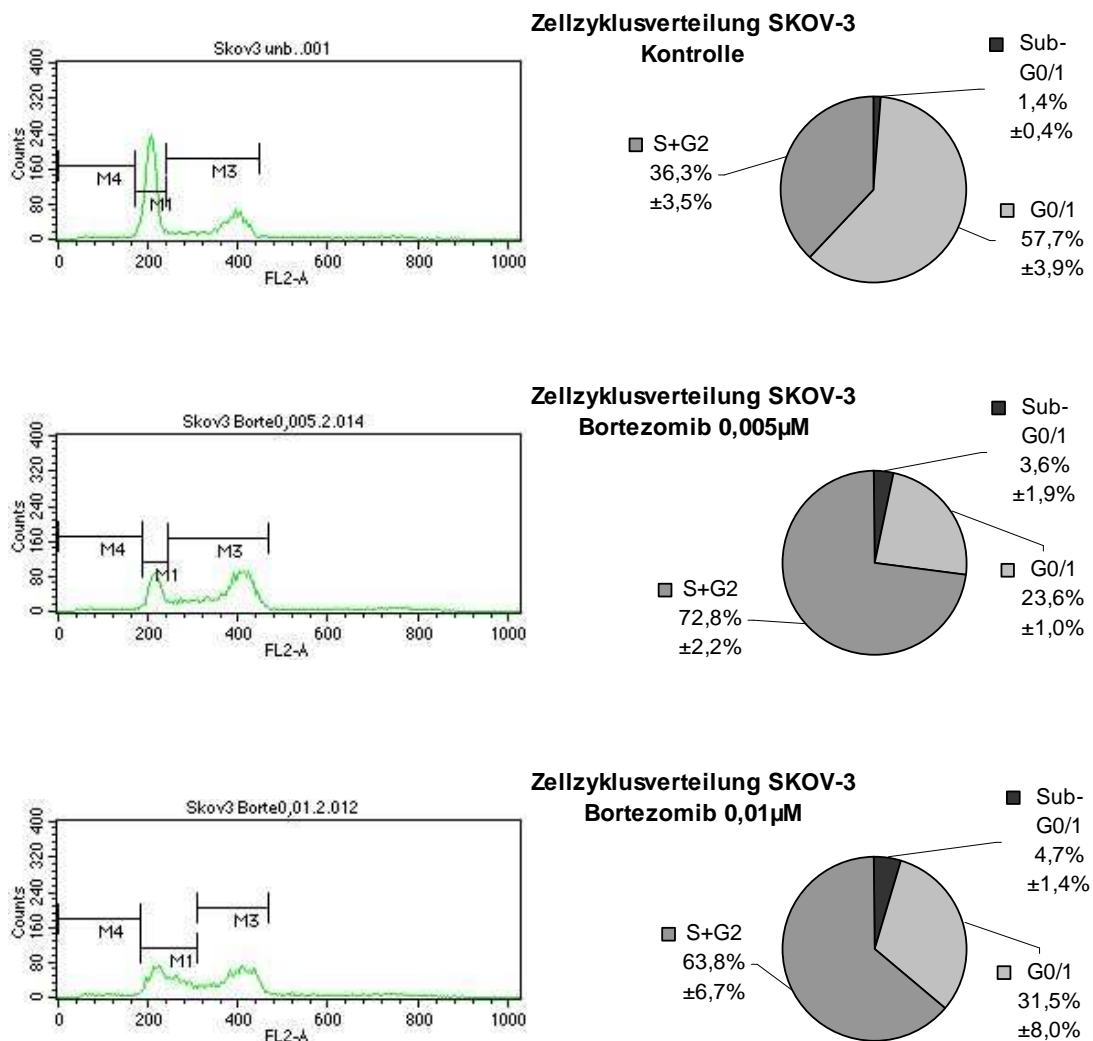


Abb. 21 Zellzyklusanalyse der SKOV-3-Zellen nach Inkubation mit Bortezomib in ansteigender Konzentration; Zellzyklusmessung mittels Durchflusszytometrie (FACS= Fluorescence Activated Cell Sorting) nach Anfärbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI).

links: FACS-Abbildung; deutlich zu erkennen ist die Abflachung des G0/1-Peaks (M1) unter Zunahme der Zellzahl in der S+G2-Phase (M3);

rechts: Kreisdiagramme mit Verteilung der Zellen an den einzelnen Zellzyklusphasen in % mit zugehöriger Standardabweichung.

Analog zu der zuvor durchgeführten Konzentrationsreihe mit MG-115, kommt es bei den SKOV-3-Zellen zu einem relativen Abfall des Zellanteils an der G0/1-Phase um 40,1% (0,5µM) und 53,8% (1µM) und simultaner Zunahme der Zellen in der S/G2-Phase sowie der apoptotischen Zellfraktion (Sub-G0/1-Peak). Anders als in den Vorversuchen wird dieser Effekt bei höherer Dosierung also nicht schwächer, sondern nimmt weiter zu. Diese Ergebnisse sind, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe, statistisch signifikant. Bei den BG1-Zellen zeigen sich mit der Konzentrationsreihe der Einzelsubstanz vergleichbare Resultate. Bis zu einer Konzentration von 1 µmol/l nimmt der Zellanteil in der S/G2-Phase um relativ 36,5%

3 Ergebnisse

zu, während der Zellanteil in der G0/1-Phase simultan um 33,2% abfällt. Mit weiterer Konzentrationszunahme auf 5 $\mu\text{mol/l}$ lässt dieser beschriebene Effekt wieder nach, und es kommt zum signifikanten Anstieg absterbender Zellen. Der Zellanteil am Sub-G0/1-Peak liegt bei dem 5 $\mu\text{molaren}$ Ansatz bei knapp 10%.

Auch die Resultate der Kombinationsversuche von Flavopiridol, Bortezomib und MG-115 mit Carboplatin lassen deutlich eine Konzentrationsabhängigkeit erkennen. So entsprechen die Ergebnisse der SKOV-3-Zellen nach 24-stündiger simultaner Flavopiridol- und Carboplatin-Inkubation jenen Ergebnissen der singulären Flavopiridol-Applikation und werden durch die zusätzliche Gabe von Carboplatin, mit einer Ausnahme, nicht signifikant verändert. Lediglich im ersten, niedriger dosierten Kombinationsansatz zeigt sich ein statistisch signifikanter Abfall der Zellfraktion in der G0/1-Phase, ohne Modulation anderer Zellzyklusphasen.

Bei der BG1-Zelllinie ist der Verlust der Zellzahl in der S/G2-Phase von 27,5% im zweiten Kombinationsansatz signifikant, verglichen mit dem reinen 1 $\mu\text{molaren}$ Flavopiridol-Ansatz. Simultan dazu nimmt in beiden Ansätzen die Rate apoptotischer Zellen signifikant zu ($\alpha < 0,05$), im zweiten Ansatz auf knapp 30% (vgl. Ansatz Flavopiridol 1 μM : 13,44%) (Abb. 22).

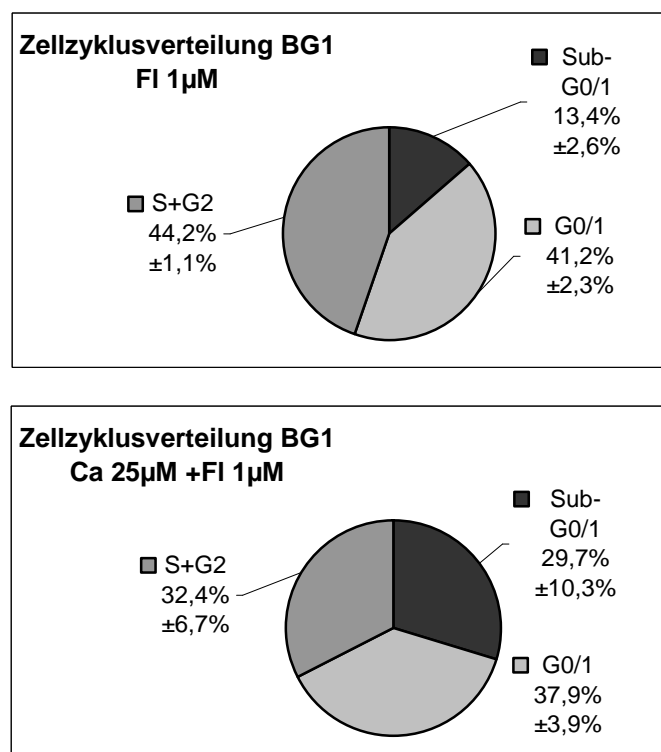


Abb. 22 Verteilung der BG1-Zellen an den einzelnen Zellzyklusphasen nach Inkubation mit 1 μmol Flavopiridol (=FI) für 24 Stunden (oben) und Zugabe von 25 μmol Carboplatin (=Ca) (unten): massive Zunahme der Zelltrümmer unter simultaner Behandlung mit Flavopiridol und Carboplatin;

3 Ergebnisse

Die Resultate basieren auf der Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie (FACS= Fluorescence Activated Cell Sorting) nach Anfärbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI). Kreisdiagramme mit Verteilung der Zellen an den einzelnen Zellzyklusphasen in % mit zugehöriger Standardabweichung.

Die Analyse der Kombination von Carboplatin mit Bortezomib zeigt bei den SKOV-3-Zellen im Vergleich zur Reinsubstanz einen Wiederanstieg der Zellen in der G0/1-Phase um 9,3% (Ansatz 1) und 45,3% (Ansatz 2). Gleichzeitig geht der Zellanteil an der S/G2-Phase um circa 20% in beiden Ansätzen zurück (Abb. 23). Statistisch signifikant ist dieser Effekt jedoch nur im höher konzentrierten Ansatz. Der Zellanteil am Sub-G0/1-Peak bleibt durch die Kombination beider Medikamente unverändert. Bei den BG1-Zellen führt die zusätzliche Inkubation mit Carboplatin zu keiner signifikanten Veränderung in der Modulation des Zellzyklus, verglichen mit den Resultaten der Reinsubstanz.

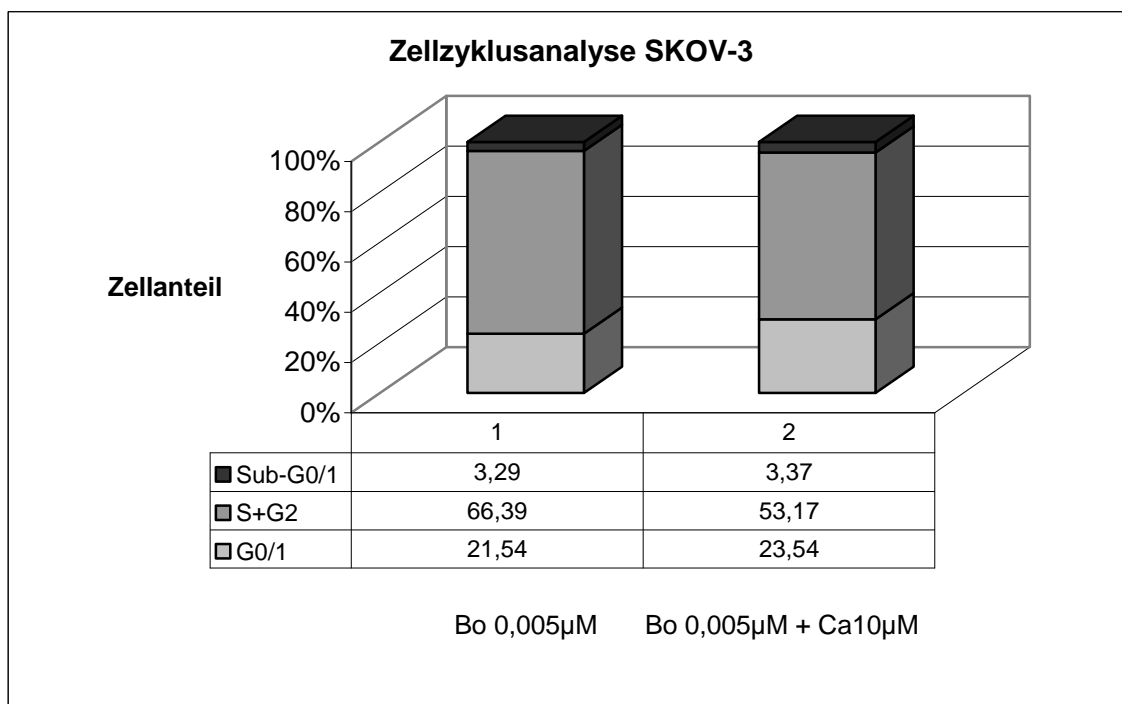


Abb. 23 Zellzyklusverteilung der SKOV-3-Zellen nach Inkubation mit 0,005µmol Bortezomib (=Bo) (links) und zusätzlicher Behandlung mit 10µmol Carboplatin (=Ca) (rechts); Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie (FACS= Fluorescence Activated Cell Sorting) nach Anfärbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI). In der Tabelle aufgeführt die prozentualen Anteile an den jeweiligen Zellzyklusphasen.

Auch die Resultate der Zellzyklusanalyse von reinem MG-115 bleiben bei beiden Zelllinien durch die Zugabe des Platinderivats unverändert.

3.2 Induktion von Apoptose

3.2.1 Annexin-V-Assay zur Analyse der Apoptose-Induktion

Bereits die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse weisen auf eine gesteigerte Apoptoserate nach Inkubation beider Zelllinien mit den vier Medikamenten hin (Sub-G0/1-Peak). Um zu differenzieren, ob es sich dabei um Apoptose oder Nekrose handelt, werden mit Hilfe der Durchflusszytometrie apoptosespezifische Merkmale untersucht. Anhand der Annexin-V-Analyse kann man zwischen vitalen Zellen und Zellen, die sich in der früh- oder spätapoptotischen/ nekrotischen Phase befinden, differenzieren und so eine Aussage über die Wirkung der verschiedenen Substanzen auf die beiden Zelllinien erhalten. Analog zur Zellzyklusanalyse sind auch im Annexin-V-Assay die Ergebnisse abhängig von der jeweiligen Dosierung des Medikaments, mit der die Zellen inkubiert werden. Beachtlich ist der bereits hohe Anteil avitaler BG1-Zellen in der unbehandelten Kontrollgruppe. Nur knapp 80% der Zellen sind zum Zeitpunkt der Analyse noch vital (vergleiche SKOV-3-Zellen 93,6%). Trotz äußerster Sorgfalt beim Ernten und in der weiteren Verarbeitung befinden sich bereits 18,6% der unbehandelten BG1-Zellen in der Frühapoptose (vergleiche SKOV-3 5,8%) (Abb. 24).

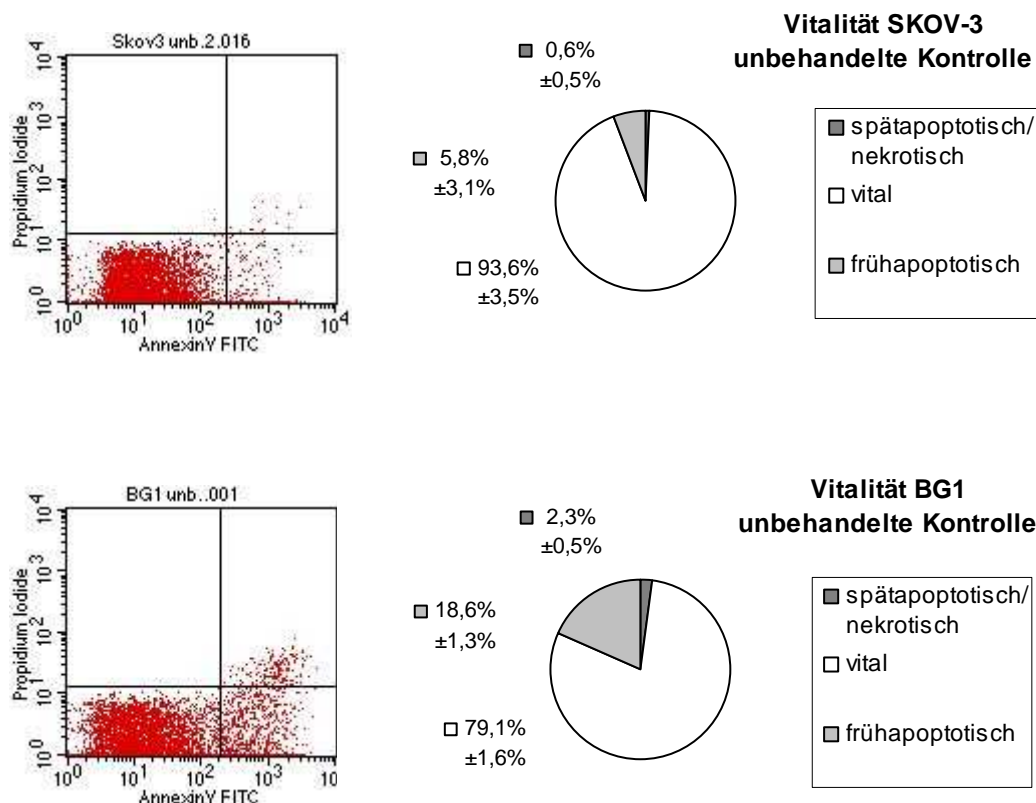
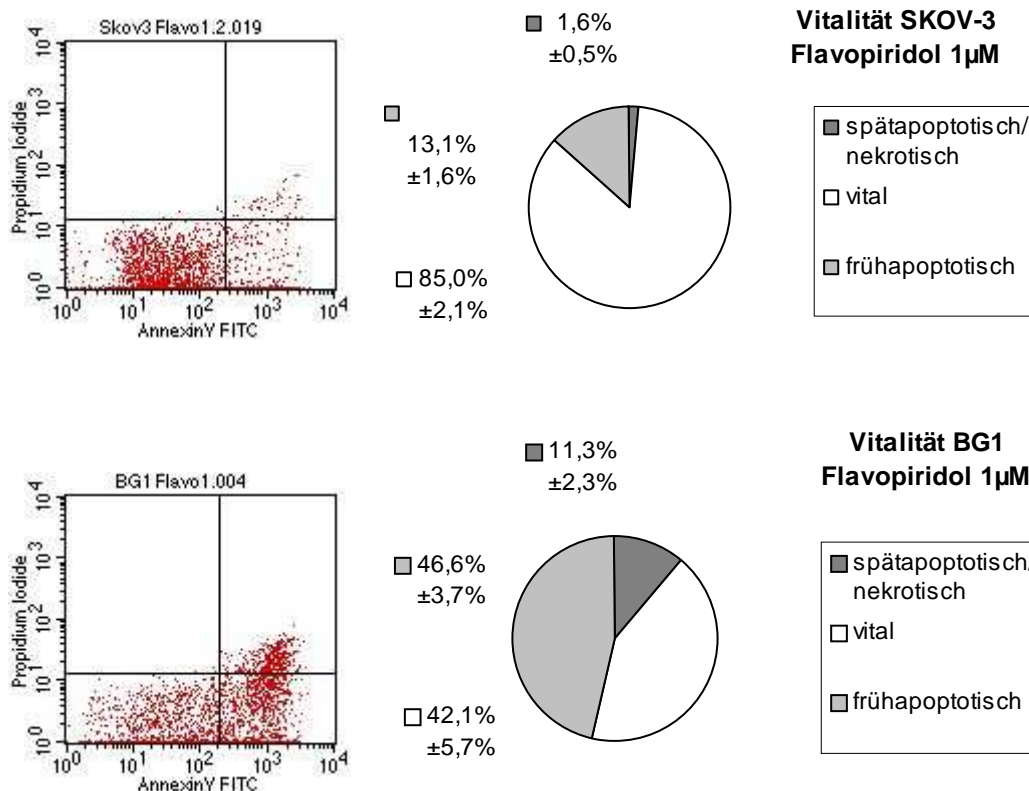


Abb. 24 direkter Vergleich der Vitalität unbehandelter SKOV-3- (oben) und BG1-Zellen (unten); links Darstellung der FACS-Analyse nach Anfärben der Zellen mit Propidiumiodid (=PI) und/

3 Ergebnisse

oder Annexin-V; rechts Kreisdiagramme mit prozentualer Verteilung der Zellen an den einzelnen Vitalitätsniveaus und zugehöriger Standardabweichung; Beachtlich ist der bereits hohe Anteil avitaler BG1-Zellen in der unbehandelten Kontrollgruppe (im Vergleich: SKOV-3 93,6% vitale Zellen).

Während durch die Inkubation mit Carboplatin bei den SKOV-3-Zellen eine signifikante Veränderung der Zellvitalität ausbleibt, reagieren die BG1-Zellen bereits auf die Inkubation mit 10µmolarer Carboplatin-Lösung mit einer relativen Abnahme der vitalen Zellzahl um 3,7% und simultaner Zunahme der frühapoptotischen Zellen um 11%. Im höher konzentrierten Ansatz ist dieser Effekt jedoch nicht mehr nachweisbar. Auch die Inkubation mit 0,1µmol Flavopiridol führt bei den SKOV-3-Zellen zu keiner signifikanten Zunahme der Apoptose- oder Nekroserate. Erst im 1µM-Ansatz zeigt sich eine signifikante Abnahme der Zellvitalität um 9,3% mit simultaner Zunahme der frühapoptotischen Zellen um 13,3% und der nekrotischen Zellzahl auf 1,6%. Während Flavopiridol die Vitalität der SKOV-3-Zellen also nur in der höheren Konzentration zu beeinflussen scheint, nimmt bei den BG1-Zellen bereits im 0,1µM-Ansatz die Zellvitalität signifikant um 25,1% ab. Gleichzeitig steigt die Zelltodrate. Im zweiten, höher konzentrierten Ansatz fällt die Zahl vitaler Zellen gar um 46,7%. Auch der Anteil nekrotischer Zellen nimmt in beiden Ansätzen signifikant um 9,9% (Ansatz 1) und 11,3% (Ansatz 2; vergleiche SKOV-3 1,6%) zu (Abb. 25).



3 Ergebnisse

Abb. 25 direkter Vergleich der SKOV-3- (oben) und BG1-Zellen (unten) nach Inkubation mit 1 μ mol Flavopiridol für 24 Stunden; links Darstellung der FACS-Analyse nach Anfärben der Zellen mit Propidiumiodid (=PI) und/ oder Annexin-V; rechts Kreisdiagramme mit prozentualer Verteilung der Zellen an den einzelnen Vitalitätsniveaus und zugehöriger Standardabweichung.

Wie schon unter Flavopiridol, kommt es auch unter Bortezomib erst im höher konzentrierten Ansatz zu einer signifikanten Veränderung in der SKOV-3-Zellvitalität. Die Zahl apoptotischer Zellen beträgt hier 10%, verglichen mit 5,8% in der unbehandelten Kontrollgruppe. Statistisch signifikant ist hingegen die Abnahme der Vitalität in beiden Ansätzen der BG1-Zelllinie. Dabei sind die Veränderungen ähnlich jenen aus den zuvor beschriebenen Flavopiridol-Ansätzen. Die Zahl frühapoptotischer Zellen steigt statistisch signifikant um relativ 49,4% (0,01 μ mol/l) und 133,3% (0,05 μ mol/l) an. Unter Bortezomib nimmt jedoch die Zahl spätapoptotischen/ nekrotischen Zellen stärker zu und steigt bis auf 14,5% (0,01 μ mol/l) und 12,6% (0,05 μ mol/l). Im direkten Vergleich zwischen BG1- und SKOV-3-Zellen, die mit 0,01 μ mol/l Bortezomib inkubiert wurden lässt sich deutlich erkennen, dass bei den BG1-Zellen bereits knapp 30% der Zellen die Apoptose eingeleitet haben. Der Anteil frühapoptotischer Zellen bei der SKOV-3-Zelllinie hingegen überschreitet 10% der Gesamtzellzahl nicht. Die BG1-Zellen zeigen außerdem eine deutliche Zunahme der Nekroserate um das 6,5-fache des Ausgangswerts (2,2% bei der unbehandelten Kontrollgruppe), während sich diese bei den SKOV-3-Zellen nur unwesentlich ändert (Abb. 26).

3 Ergebnisse

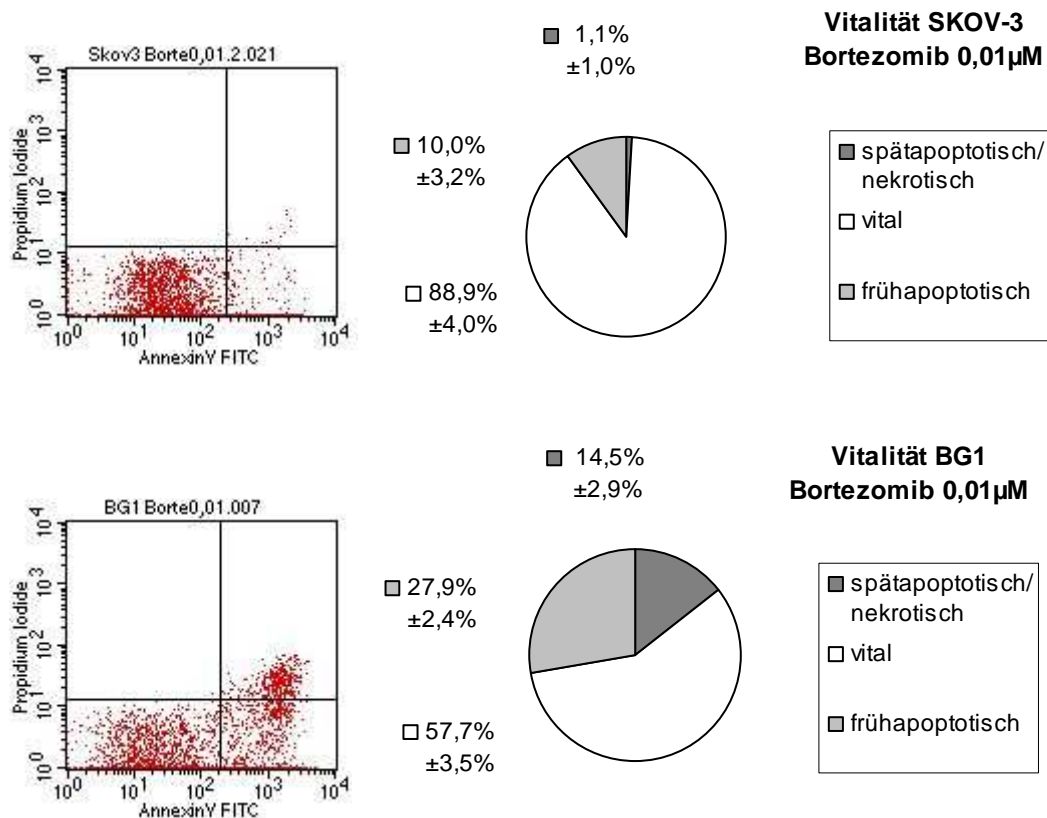


Abb. 26 direkter Vergleich der SKOV-3- (oben) und BG1-Zellen (unten) nach Inkubation mit 0,1 µmol Bortezomib für 24 Stunden; links Darstellung der FACS-Analyse nach Anfärben der Zellen mit Propidiumiodid (=PI) und/ oder Annexin-V; rechts Kreisdiagramme mit prozentualer Verteilung der Zellen an den einzelnen Vitalitätsniveaus und zugehöriger Standardabweichung.

Im Gegensatz zu den Bortezomib-Ansätzen, reagieren die SKOV-3-Zellen auf das synthetische Analogon MG-115 mit einer signifikanten relativen Abnahme der vitalen Zellzahl von 6,9% (0,5 µmol/l) und 14,9% (1 µmol/l). Simultan nimmt die Zahl frühapoptotischer Zellen zu. Der Anteil nekrotischer Zellen bleibt unverändert niedrig, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Der Anteil an vitalen Zellen ist mit 87,2% (0,5 µM) und 79,6% (1 µM) in beiden Ansätzen immer noch vergleichsweise hoch. Bei den BG1-Zellen kommt es analog zu den mit Bortezomib-inkubierten Ansätzen zur statistisch signifikanten Abnahme der Zellvitalität von 40,4% im ersten Ansatz (1 µmol/l) und 55,6% im zweiten Ansatz (5 µmol/l). Gleichzeitig nimmt die Zahl frühapoptotischer Zellen deutlich auf 21,7% (Ansatz 1) beziehungsweise 39,9% (Ansatz 2) der Gesamtzellzahl zu. Der Anteil nekrotischer Zellen steigt, wie schon unter Bortezomib, bei dem niedriger konzentrierten Ansatz (1 mmol/l) mit 10,1% stärker als bei höherer Dosierung (5 mmol/l), bei dem die Zellzahl wieder auf statistisch nicht signifikante 3,9% der Gesamtzellzahl abfällt. Stellt man die Ergebnisse der 1 µmolaren MG-115-Ansätze der BG1- und SKOV-3-Zelllinien einander gegenüber, fällt auch hier auf, dass die BG1-Zellen auf die Substanz in gleicher Konzentration stärker mit

3 Ergebnisse

Vitalitätsverlust und Zunahme der Apoptoserate reagieren als die SKOV-3-Zellen (Abb. 27).

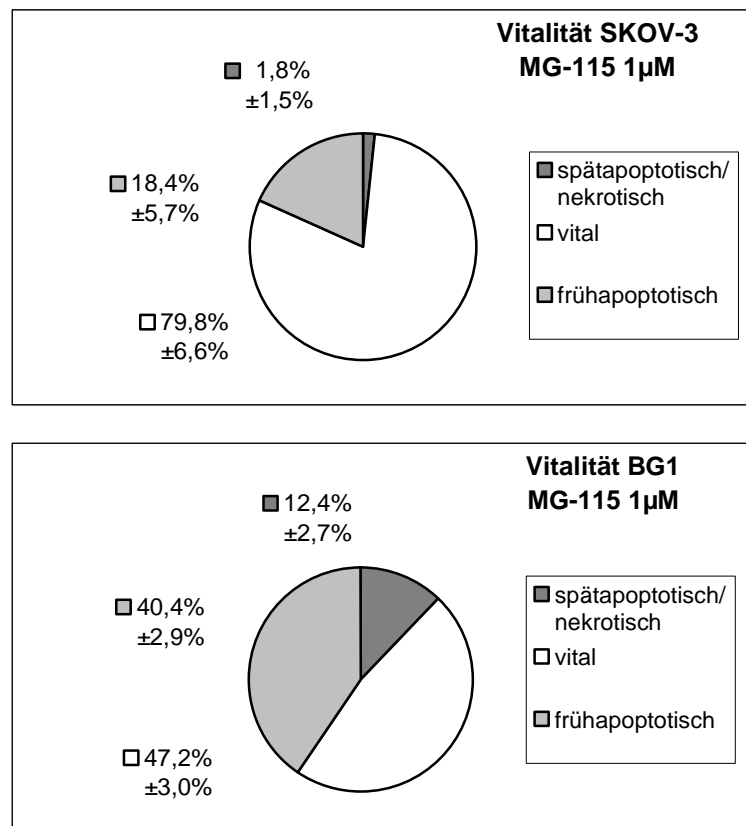


Abb. 27 direkter Vergleich der SKOV-3- (oben) und BG1-Zellen (unten) nach Inkubation mit 1µmol MG-115 für 24 Stunden; Analyse mittels Durchflusszytometrie nach Anfärbung der Zellen mit Propidiumiodid (=PI) und/ oder Annexin-V; Kreisdiagramme mit prozentualer Verteilung der Zellen an den einzelnen Vitalitätsniveaus mit zugehöriger Standardabweichung.

3.2.2 Annexin-V-Assay zur Analyse der Apoptose-Induktion durch die Kombination von Carboplatin mit Flavopiridol, Bortezomib und MG-115

Vergleicht man die Versuchsansätze, bei denen SKOV-3-Zellen mit Flavopiridol, Bortezomib und MG-115 jeweils in Kombination mit Carboplatin inkubiert wurden, so zeigt sich im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe in allen Ansätzen eine signifikante Abnahme vitaler Zellen mit simultane Zunahme vor allem der apoptotischen Zellfraktion. Einzige Ausnahmeh ist der tiefer dosierte Carboplatin/ Flavopiridol-Ansatz. Die quantitative Analyse der Dotplots jedoch ergibt in keinem der Ansätze eine statistisch signifikante Veränderung, im Vergleich zur jeweils singulären Applikation.

Auch bei den BG1-Zellen nimmt, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, in allen Kombinationsansätzen die Zellvitalität signifikant ab. Simultan steigt die Zahl absterbender Zellen. Vergleicht man auch hier die Resultate der Kombinationsansätze

3 Ergebnisse

in denen der Einzelsubstanzen, lassen sich vereinzelt statistisch signifikante Unterschiede detektieren.

Im niedriger konzentrierten Kombinationsansatz der BG1-Zellen von Flavopiridol mit Carboplatin sind die Ergebnisse im direkten Vergleich mit jenen nach singulärer Applikation nicht statistisch signifikant verändert. Der zweite, höher konzentrierte Ansatz zeigt jedoch eine deutliche Abnahme der Zellvitalität um 32,6% mit simultaner Zunahme sowohl der frühapoptotischen Fraktion um 15,2%, als auch der spätapoptotischen/ nekrotischen Zellzahl um 58,6% (Abb. 28).

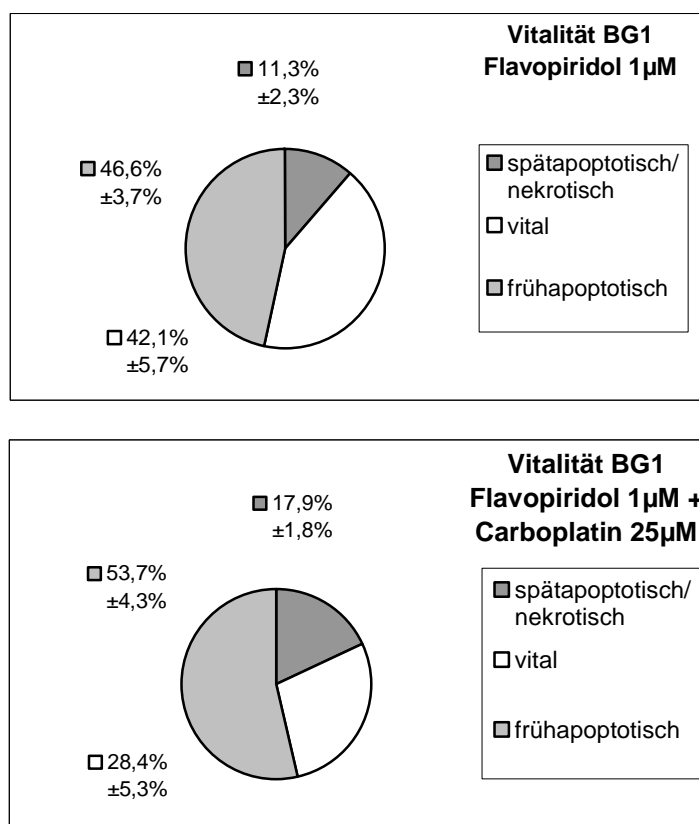


Abb. 28 direkter Vergleich der BG1-Zellen nach Inkubation mit 1µmol Flavopiridol für 24 Stunden (oben) und simultaner Behandlung mit 1µmol Flavopiridol und 25µmol Carboplatin (unten); Analyse mittels Durchflusszytometrie nach Anfärbung der Zellen mit Annexin-V und/ oder Propidiumiodid (=PI); Kreisdiagramme mit prozentualer Verteilung der Zellen an den einzelnen Vitalitätsniveaus mit zugehöriger Standardabweichung.

Abgesehen von einer Zunahme der spätapoptotischen/ nekrotischen Zellzahl auf 1,5% der Gesamtzellzahl im ersten Ansatz der simultanen Kombination von Carboplatin mit Bortezomib, können in keinem der beiden Ansätze weitere signifikante Veränderungen der bereits unter Bortezomib beobachteten Effekte detektiert werden. Auch unter MG-115 vermag die zusätzliche Inkubation mit Carboplatin bei den BG-1-Zellen für keine statistisch signifikanten Effekte sorgen. Einzige Ausnahme ist hier eine Abnahme der

3 Ergebnisse

vitalen Zellzahl im niedriger konzentrierten Ansatz um relativ 7,4%, verglichen mit dem reinen 0,5µM MG-115-Ansatz.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Carboplatin bei den SKOV-3-Zellen in den verwendeten Konzentrationen keinen signifikanten Effekt in Bezug auf die Vitalität der Zellen hat. Auch Bortezomib zeigt nur geringe Effekte, während Flavopiridol zumindest im höher konzentrierten Ansatz zu signifikanten Verlusten der Zellvitalität führt. Unter MG-115 zeigt sich hingegen in beiden Ansätzen die Toxizität mit Zunahme von absterbenden Zellen. Die simultane Inkubation mit Carboplatin sorgt bei den SKOV-3-Zellen für keinen zusätzlichen Effekt.

Bei den BG1-Zellen hingegen kommt es bei allen Substanzen zu einer signifikanten Abnahme der Zellvitalität mit simultanem Anstieg der Apoptose- und Nekroserate ($\alpha < 0,05$). Ausnahme ist hier die Inkubation mit Carboplatin. Lediglich im 10µM Ansatz sind die beschriebenen Effekte statistisch signifikant, wohingegen der höher konzentrierte 25µM Ansatz, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, keine Veränderung der Zellvitalität zeigt (Abb. 29).

Eindeutige und statistisch signifikante Veränderung durch die simultane Behandlung von Carboplatin mit Flavopiridol, Bortezomib oder MG-115 ergeben sich nur bei dem hochkonzentrierten Flavopiridol-Ansatz der BG1-Zellen (siehe Abb. 28). Ansonsten zeigt auch hier der Zusatz des Platinderivats bei keiner der Substanzen einen zusätzlichen Effekt.

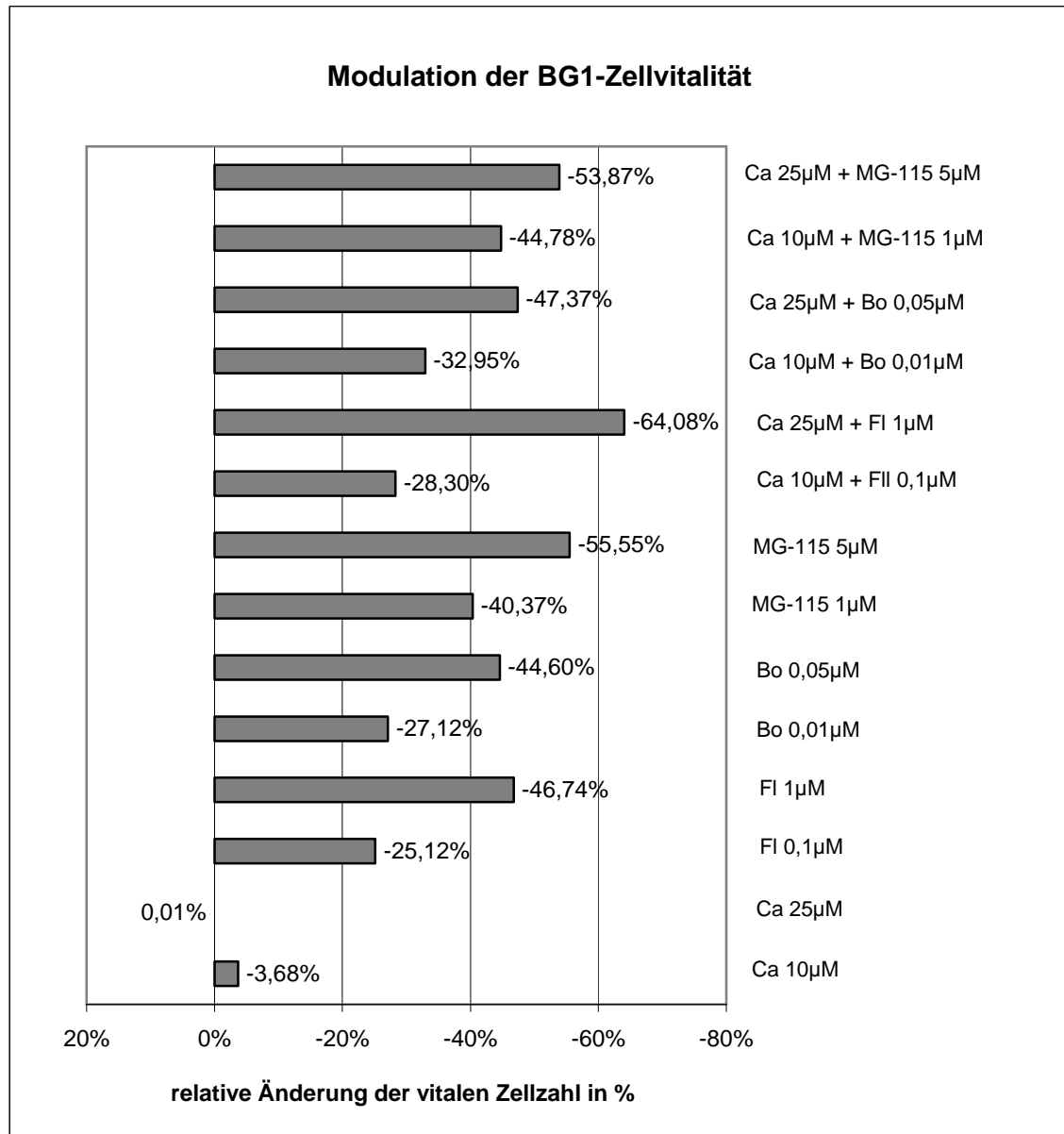


Abb. 29 prozentuale Abnahme der vitalen BG1-Zellzahl nach 24-stündiger Inkubation mit den zytotoxischen Substanzen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle; Analyse mittels Durchflusszytometrie nach Anfärbung der Zellen mit Annexin-V und/ oder Propidiumiodid (=PI); Ca= Carboplatin, FI= Flavopiridol, Bo= Bortezomib

3.3 Western Blot-Analyse von Apoptose-Faktoren

Es konnte bisher gezeigt werden, dass Carboplatin, Flavopiridol, Bortezomib und MG-115 dosisabhängig Apoptose in malignen Zellen induzieren können. Nachfolgend wird untersucht, inwiefern der intrinsische und/ oder extrinsische Signalweg dafür von Bedeutung sind. Auf Grund der komplexen Versuchsansätze wird auf die Verwendung von MG-115 verzichtet. Dem Proteasomeninhibitor werden als synthetischem Analogon von Bortezomib vergleichbare Effekte zugeschrieben.

3 Ergebnisse

Es wurde die Proteinexpression im Gesamtzelllysat der SKOV-3- und BG1-Zellen nach 8, 16 und 24 Stunden Inkubation mit den zytotoxischen Substanzen im qualitativen Western Blot analysiert. Verwendet wurden spezifische Antikörper, welche die Proform der Effektor-Caspase 3, sowie die (inaktive) Proform und die (aktive) cleaved form der Initiator-Caspasen 8 und 9 detektieren. Als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Gele wurden die Membranen nach erfolgreichem stripping mit einem β -Actin 42-Antikörper inkubiert.

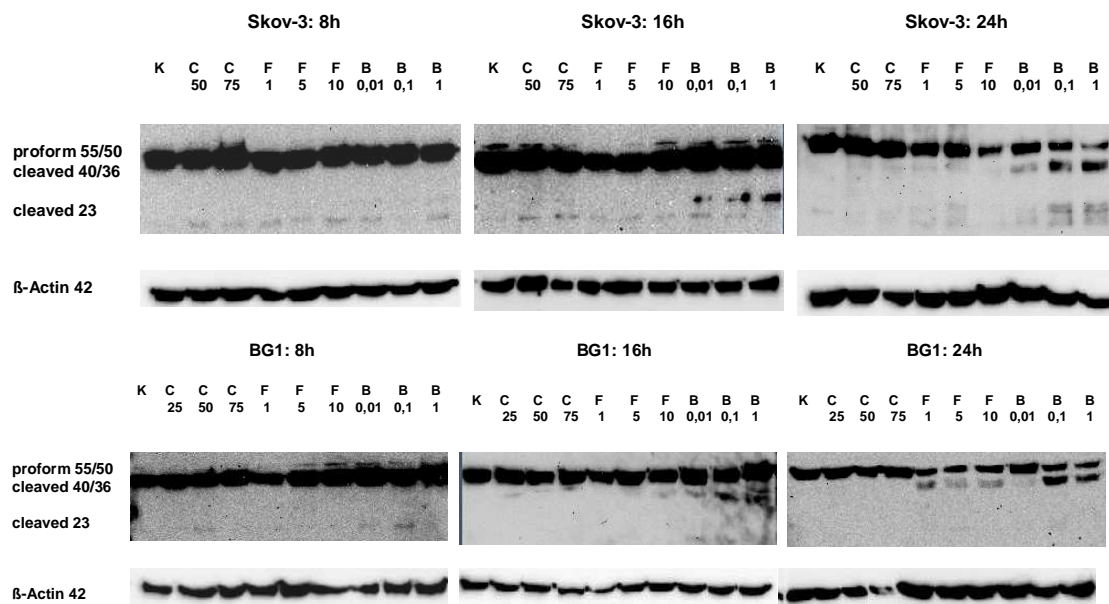


Abb. 30 Western Blot-Analyse der Caspasen 8 bei SKOV-3- (oben) und BG1-Zellen (unten) nach 8-, 16- und 24-stündiger Inkubation mit Carboplatin (C), Flavopiridol (F) und Bortezomib (B) in ansteigender Konzentration (Angaben in μ mol), K= unbehandelte Kontrolle; Ladekontrolle mit beta-Aktin 42; links von den Abbildungen ist die Proteingröße in kD angegeben.

In Abbildung 30 sind die Ergebnisse der Western Blot-Analyse zur Detektion der Caspasen 8 dargestellt. Dabei wird in allen Ansätzen die inaktive Proform der Caspase 8 bei 55/50 kD deutlich exprimiert. Während die Aktivierung nach 8 Stunden noch sehr undeutlich zu sein scheint, kann die aktive Form dieser Caspase (40/36kD und 23kD) bei beiden Zelllinien nach 16- und 24-stündiger Inkubation mit Bortezomib deutlich nachgewiesen werden. Dabei fällt die Bande umso kräftiger aus, je höher die Bortezomib-Konzentration in der Zellkultur war. Auffallend ist bei den BG1-Zellen, dass die Bande bei mittlerer Konzentration des Proteasomen-Inhibitors (0,1 μ M) stärker zu sein scheint als nach Inkubation mit 10-facher Bortezomib-Konzentration (1 μ M). Außerdem ist im 0,1 μ molaren Ansatz bereits nach 8 Stunden Inkubationsdauer eine schwache Bande sichtbar.

Unter dem CDK-Inhibitor Flavopiridol kann bei den SKOV-3-Zellen, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, nicht eindeutig eine Zunahme der Bandenstärke der

3 Ergebnisse

aktivierten Caspase 8 nachgewiesen werden, während bei den BG1-Zellen nach 24 Stunden bei allen drei Ansätzen deutlich Banden bei 40/36kD sichtbar werden.

Bei den mit Carboplatin inkubierten BG1-Ansätzen zeigen sich lediglich bei dem acht Stunden Blot des 50µmolaren Versuchsansatzes (23kD) und dem 16 Stunden Blot (40/36kD) angedeutete Banden, die der aktiven Form der Caspase entsprechen, während bei den SKOV-3-Zellen im 16 Stunden Blot in beiden Carboplatin-Ansätzen schwache Banden sichtbar werden (23kD).

Um den Effekt der Kombination von Carboplatin mit Flavopiridol beziehungsweise Bortezomib auf das Apoptose-Verhalten und die Aktivierung von Signalkaskaden zu analysieren, werden repräsentativ von beiden Zelllinien je ein 24-stündiger Ansatz mit Carboplatin und Flavopiridol beziehungsweise Carboplatin und Bortezomib angesetzt, lysiert und im Western Blot mit den drei erwähnten Antikörpern analysiert. Dabei bleibt bei beiden Ansätzen der SKOV-3-Zelllinie eine Aktivierung der Caspase 8 aus, trotz des positiven Ergebnisses aus jenem Ansatz mit Bortezomib als Reinsubstanz (Abb. 31). Bei den BG1-Zellen werden sowohl im Kombinationsansatz von Carboplatin und Flavopiridol, als auch im Ansatz Carboplatin und Bortezomib schwache Banden bei 40/36kD sichtbar, die der Aktivierung der Caspase 8 entsprechen. Dabei ist die Bande der Kombination von Carboplatin und Bortezomib wesentlich schwächer ausgeprägt als jene nach singularärer Bortezomib-Applikation.

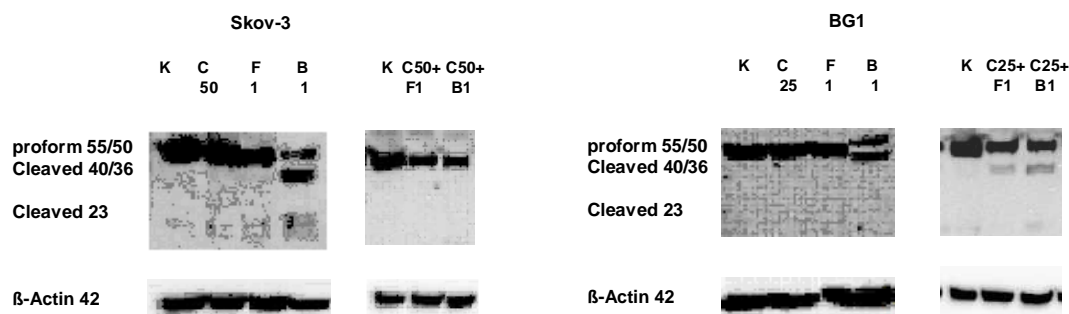


Abb. 31 Western Blot-Analyse der Caspasen 8 bei SKOV-3- (links) und BG1-Zellen (rechts) nach 24-stündiger Inkubation mit Carboplatin (C), Flavopiridol (F) und Bortezomib (B) einzeln und in Kombination (Angaben in µmol), K= unbehandelte Kontrolle; Ladekontrolle mit beta-Aktin 42; links von den Abbildungen ist die Proteingröße in kD angegeben.

Die Proform der Effektor-Caspase 3 wird von beiden Zelllinien in allen Ansätzen deutlich exprimiert (Abb. 32). Während es bei den SKOV-3-Zellen unter Carboplatin zu keinerlei Veränderung der Bandenstärke kommt, scheint sich im 16-stündigen Ansatz der BG1-Zellen die Bande bei 50µM schwächer darzustellen. Nach 24 Stunden ist dieser Effekt jedoch nicht mehr nachweisbar. Sowohl unter Flavopiridol, als auch Bortezomib werden bei den SKOV-3-Zellen die Banden mit zunehmender

3 Ergebnisse

Inkubationsdauer und Konzentration schwächer. Auch bei den BG1-Zellen kommt es bereits nach 8 Stunden Inkubation mit dem CDK-Inhibitor in allen drei Ansätzen zu einer deutlichen Abnahme der Bandenstärke. Während nach 16 Stunden dieser Effekt wieder abzunehmen scheint, zeigen sich nach 24 Stunden Inkubation mit Flavopiridol in allen drei Ansätzen erneut gleichmäßig schwache Banden. Ebenso zeigen auch jene mit Bortezomib inkubierten BG1-Ansätze konzentrationsabhängig eine Abnahme der Pro-Caspasen 3-Bandenstärke. Während analog zu den mit Flavopiridol inkubierten Ansätzen dieser Effekt nach 16 Stunden wieder abzunehmen scheint, zeigt sich nach 24 Stunden mit zunehmender Konzentration des Proteasomeninhibitors eine Abnahme der Bandenstärke (Abb. 32). Während es also bei keiner der beiden Zelllinien durch die Inkubation mit Carboplatin zu einer eindeutigen Modifikation der Pro-Caspasen 3-Aktivität kommt, reagieren sowohl die SKOV-3- als auch BG1-Zellen auf die Inkubation mit Flavopiridol und Bortezomib zeit- und konzentrationsabhängig mit einer Abnahme der Expressierung der Pro-Caspase 3.

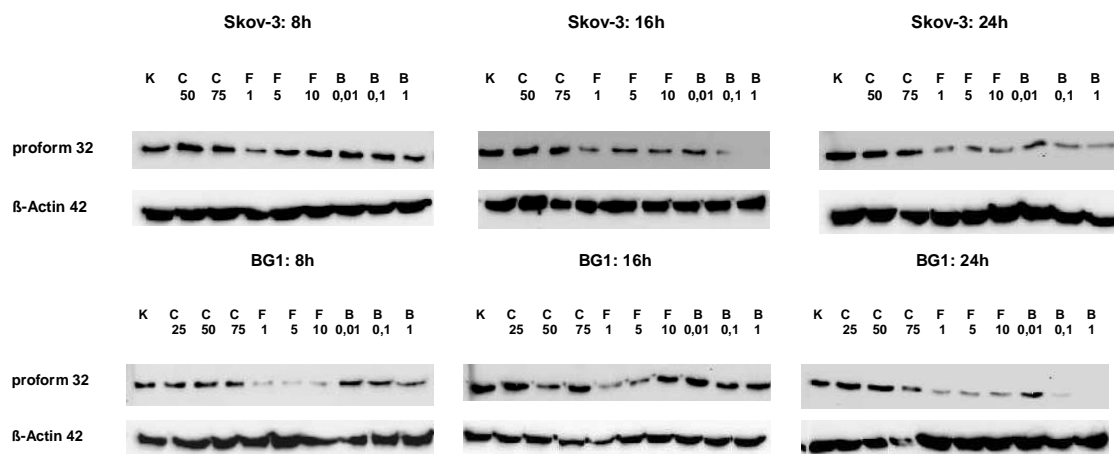


Abb. 32 Western Blot-Analyse der Caspasen 3 bei SKOV-3- (oben) und BG1-Zellen (unten) nach 8-, 16- und 24-stündiger Inkubation mit Carboplatin (C), Flavopiridol (F) und Bortezomib (B) in ansteigender Konzentration (Angaben in μmol), K= unbehandelte Kontrolle; Ladekontrolle mit beta-Aktin 42; links von den Abbildungen ist die Proteingröße in kD angegeben.

Bei den Kombinationsansätzen der SKOV-3-Zellen von Carboplatin und Flavopiridol sowie Carboplatin und Bortezomib sind, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, unverändert deutliche Banden der Pro-Caspase 3 entsprechend sichtbar. Bei den BG1-Zellen hingegen sind diese nur noch angedeutet zu sehen (Abb. 33).

3 Ergebnisse

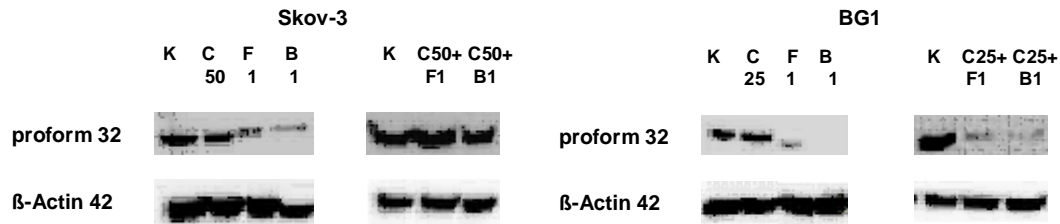


Abb. 33 Western Blot-Analyse der Caspase 3 bei SKOV-3- (links) und BG1-Zellen (rechts) nach 24-stündiger Inkubation mit Carboplatin (C), Flavopiridol (F) und Bortezomib (B) einzeln und in Kombination (Angaben in μmol), K= unbehandelte Kontrolle; Ladekontrolle mit beta-Aktin 42; links von den Abbildungen ist die Proteingröße in kD angegeben.

Für Caspase 9 sind alle Ansätze negativ. Weder die Banden der inaktiven Proform, noch der gespaltenen aktiven Form können im Western Blot dargestellt werden.

Nachfolgend wird untersucht, ob denn die der Aktivierung von Caspase 9 vorausgehende mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C mittels Western Blot detektiert werden kann.

Cytochrom C ist im Western Blot bei beiden Zelllinien sowohl in den zytosolischen als auch mitochondrialen Lysaten deutlich nachweisbar. Dabei ist der Cytochrom C-Gehalt in allen mitochondrialen Ansätzen wesentlich höher als im Zytoplasma. Bei ähnlicher Proteinmenge (22 μg Zytoplasma versus 17,5 μg Mitochondrien) sind hier Banden wesentlich kräftiger als jene der Zytoplasma-Lysate (Abb. 34 + 35).

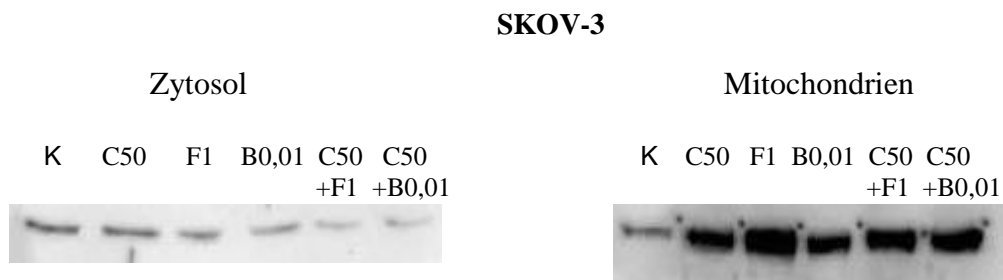


Abb. 34 Western Blot-Analyse der Cytochrom C-Expression der SKOV-3-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Carboplatin (C), Flavopiridol (F) und Bortezomib (B) einzeln und in Kombination (Angaben in μmol), K= unbehandelte Kontrolle; links von den Abbildungen ist die Proteingröße in kD angegeben.

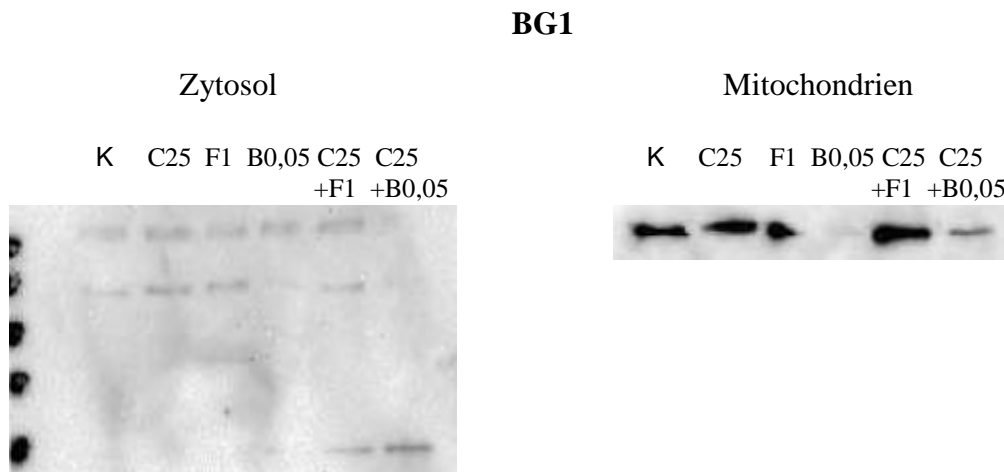


Abb. 35 Western Blot-Analyse der Cytochrom C-Expression der BG1-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Carboplatin (C), Flavopiridol (F) und Bortezomib (B) einzeln und in Kombination (Angaben in μmol), K= unbehandelte Kontrolle; links von den Abbildungen ist die Proteingröße in kD angegeben.

Vergleicht man jedoch die Banden jener Ansätze, die mit den zytotoxischen Substanzen inkubiert wurden, mit den Banden der unbehandelten Kontrolle, ist kein Unterschied zu detektieren. In keinem der Ansätze kann die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien mit simultaner Zunahme im Zytosol gezeigt werden. Lediglich bei den mit Bortezomib-inkubierten BG1-Zellen scheint es zu einer deutlichen Abnahme der Bandenstärke bei den Mitochondrien-Lysaten zu kommen, ohne dass jedoch eine simultane Zunahme der Bandenstärke im Zytosol zu detektieren ist (Abb. 35). Bei den SKOV-3-Zellen scheint außerdem sogar der Cytochrom C-Gehalt in den Mitochondrien in der unbehandelten Kontrollgruppe geringer zu sein als jener in den behandelten Ansätzen (Abb. 34). Eine Aussage bezüglich der Apoptoseinduktion über den mitochondrialen Weg mittels Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien durch Carboplatin, Flavopiridol und Bortezomib ist somit nicht sicher zu treffen.

3.4 Modulation der NF κ B-Aktivität

Um den Einfluss von Carboplatin, Flavopiridol, Bortezomib und MG-115 auf die NF κ B-Aktivität zu untersuchen, wurde das *TransAM NF- κ B Family Kit* verwendet. Die Methode basiert auf dem Prinzip des Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Dabei wird das aktive Nf κ B-Protein an eine Mikrotiterplatte gebunden. Daran spezifisch andockende Antikörper werden wiederum von Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern gebunden, welche photometrisch detektiert werden können. Die Modulation der Nf κ B-Aktivität beider Zelllinien nach Inkubation mit zytotoxischen Substanzen variiert stark.

3 Ergebnisse

Bei der SKOV-3-Zelllinie führt lediglich die 20-stündige Inkubation mit Flavopiridol zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung des NfκB-Proteins um durchschnittlich 41,4%. Analog dazu zeigt sich auch nach simultaner Inkubation des CDK-Inhibitors mit Carboplatin eine Zunahme der NfκB-Aktivität (+68,7%), verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, wie auch im Vergleich zu jenem Ansatz, der nur mit Flavopiridol inkubiert wurde (+19,7%). Mit $\alpha < 0,05$ sind diese Resultate als hoch statistisch signifikant einzustufen (Abb. 36). Die Inkubation mit Carboplatin, Bortezomib und MG-115 führt weder bei den Reinsubstanzen noch den Kombinationsansätzen zu einer nennenswerten Veränderung der NfκB-Aktivität. Dabei schwanken die Resultate der einzelnen Versuchsansätze teils erheblich.

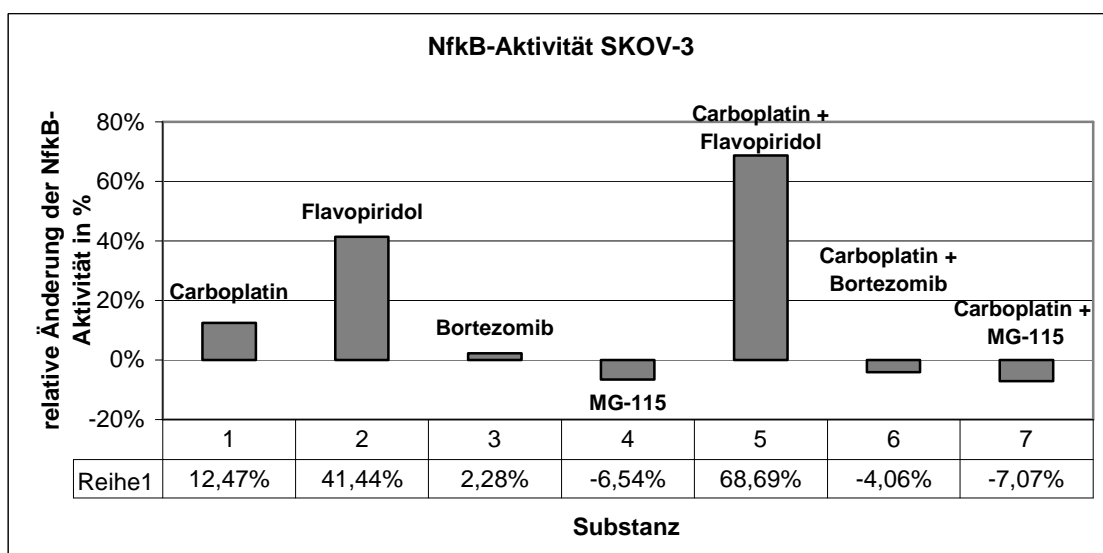


Abb. 36 ELISA der SKOV-3-Zellen zur Quantifizierung der NfκB-Aktivität nach 24-stündiger Inkubation mit den zytotoxischen Substanzen. Balkendiagramm zur Darstellung der veränderten Aktivitätsniveaus des Transkriptionsfaktors in % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Bei den BG1-Zellen kommt es zu keiner statistisch signifikanten Modulation der NfκB-Aktivität nach Inkubation mit den vier Medikamenten. Zwar kann nach Inkubation mit Carboplatin eine Aktivitätssteigerung des Transkriptionsfaktors beobachtet werden. Nach Auswertung mit dem Mann Whitney U-Rangsummentest ist diese jedoch als nicht statistisch signifikant einzustufen. Die Ergebnisse von Flavopiridol, Bortezomib und MG-115 zeigen eine starke Streuung der Ergebnisse ohne statistische Signifikanz (Abb. 37).

Auch die Kombinationsansätze von Carboplatin mit Flavopiridol, Bortezomib und MG-115 führen zu einer deutlichen Aktivitätszunahme des NfκB-Dimers, diese ist jedoch analog zu den Resultaten der Reinsubstanzen als nicht statistisch signifikant einzustufen.

3 Ergebnisse

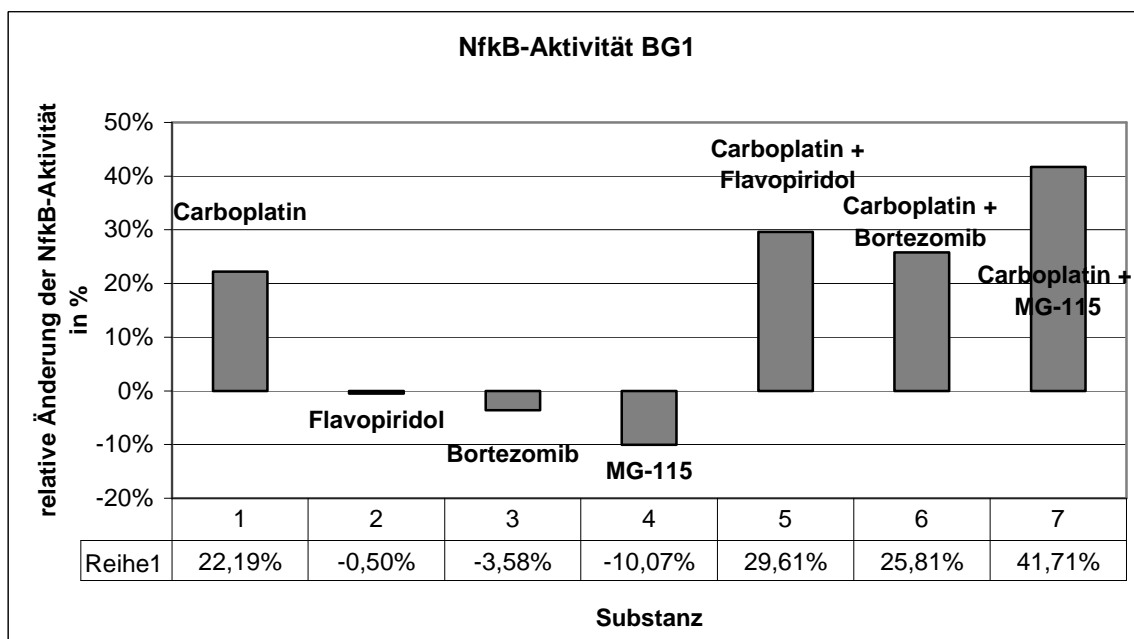


Abb. 37 ELISA der BG1-Zellen zur Quantifizierung der NfκB-Aktivität nach 24-stündiger Inkubation mit den zytotoxischen Substanzen. Balkendiagramm zur Darstellung der veränderten Aktivitätsniveaus des Transkriptionsfaktors in % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

4 Diskussion

Das Ovarialkarzinom ist der gynäkologische Tumor mit der höchsten Mortalität. Zwar haben sich in den vergangenen Jahren die Erfolgsquoten der Kombination aus chirurgischer und Chemotherapie wesentlich verbessert, dennoch ist die Rezidivrate weiterhin sehr hoch und viele Patientinnen versterben. Problematisch ist dabei die Entstehung von Resistenzen gegen die platinhaltige Chemotherapie. Durch Kombination mit Substanzen, die über andersartige Mechanismen ihre Wirkung auf zellulärer Ebene entfalten, kann versucht werden die sich ausbildenden Resistenzen zu überwinden.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb an den Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3 und BG1 neben dem bereits in der Therapie des Ovarialkarzinoms etablierten Carboplatin die beiden Proteasomen-Inhibitoren Bortezomib und MG-115 und der CDK-Inhibitor Flavopiridol auf ihre antiproliferative Wirkung mittels Durchflusszytometrie, Western Blot und ELISA untersucht. Weiterhin wurde der Frage nach einem möglichen Synergismus der drei Medikamente in Kombination mit Carboplatin nachgegangen. Dadurch könnte die Dosis der Einzelsubstanzen minimiert werden und ließe auf eine bessere Verträglichkeit der Therapie hoffen.

4.1 Wirkung von Carboplatin auf SKOV-3- und BG1-Zellen

4.1.1 Zellzyklusanalyse

Carboplatin führt durch Vernetzung zwischen benachbarten DNS-Strängen und DNS mit Proteinen zu Schäden innerhalb des Erbguts. Um die Reparatur dieser Schäden zu ermöglichen, arretieren Zellen in der S-Phase des Zellzyklus [88] [26].

Auch die Resultate der Durchflusszytometrie beider Zelllinien in dieser Arbeit können eine zeit- und konzentrationsabhängige Arretierung in der S/G2-Phase nach Inkubation mit Carboplatin zeigen. Dabei korrelieren die Höhe der verwendeten Konzentration und die Inkubationsdauer mit dem in der S/G2-Phase arretierten Zellanteil.

Da, wie eingangs aus Gründen der besseren Auswertungsmöglichkeit in dieser Arbeit die S- und G2-Phase gemeinsam als S/G2-Phase gewertet wurden, sind diese Resultate jedoch nur eingeschränkt mit jenen der Datenbanken vergleichbar.

Es zeigt sich deutlich, dass die SKOV-3-Zellen weniger empfindlich auf das Platinderivat reagieren als die BG1-Zellen. Bei äquivalenter Carboplatin-Konzentration von 50µmol in der primär durchgeführten Konzentrationsreihe kommt es bei der BG1-Zelllinie zu einer deutlichen Zunahme der apoptotischen/ nekrotischen Zellfraktion

4 Diskussion

(Sub-G0/1), während die Vitalität der SKOV-3-Zellen erhalten bleibt. Die BG1-Zelllinie zeigt sich in dieser Arbeit generell weniger robust schwankenden Umwelteinflüssen gegenüber. Bereits bei den unbehandelten Zellen liegt trotz äußerster Sorgfalt in der Versuchsdurchführung die Vitalität nur bei knapp 80%. Um die Zellen in möglichst optimalem Zustand für Experimente verwenden zu können, ist deshalb die Optimierung der Zellkulturbedingungen und Zellverarbeitung von entscheidender Bedeutung.

4.1.2 Apoptoseinduktion

Bei durch Carboplatin irreparabel geschädigten Zellen kann die Stabilisierung von Tumorsuppressorgenen wie p53 nicht nur zum Zellzyklus-Arrest, sondern auch direkt zur Aktivierung der Apoptose-Maschinerie führen [86]. Neben der vermehrten Synthese proapoptischer Bcl-2-Familienmitglieder und Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Wegs über die Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien gibt es Hinweise dafür, dass Carboplatin auch über den extrinsischen Signaltransduktionsweg zur Apoptose führt [14].

In dieser Arbeit zeigt sich bei beiden Zelllinien nach 16-stündiger Inkubationsdauer mit Carboplatin andeutungsweise eine Aktivierung der Caspase 8 (siehe 3.3). Um zu differenzieren, ob es sich dabei nur um Ausreißer innerhalb der Messreihe handelt oder es nach 16 Stunden Inkubation mit dem Platinderivat tatsächlich zur Modulation apoptosespezifischer Proteine kommt, wäre eine größere Versuchszahl ratsam mit Ausweitung des Experiments auf weitere Inkubationszeiträume und Konzentrationen. Sinnvoll wäre das vor allem für die SKOV-3-Zelllinie, da hier in den ausgewählten Konzentrationen die Vitalität nahezu unverändert war. Dies würde auch die Differenzierung erleichtern zwischen einer möglichen Platinresistenz oder der Notwendigkeit höherer Konzentrationen, um die gewünschten Effekte zu erzielen.

Da im Western Blot die Caspase 9 nicht detektierbar war, sollte die Methodik der Zellverarbeitung und die Durchführung des Western Blots überarbeitet werden. Methodische Fehler könnten so reduziert werden.

In den Datenbanken finden sich Hinweise darauf, dass es durch Carboplatin auch Caspasen-unabhängig zur Apoptoseeinleitung kommen kann. Ein Beispiel dafür ist die Translokation des Apoptose-induzierenden Faktors aus den Mitochondrien in den Zellkern mit nachfolgender Fragmentierung der DNS. Bisher konnte dies experimentell nur für die Behandlung von SKOV-3-Zellen mit Taxanen nachgewiesen werden [3]. Dies wäre jedoch eine Erklärungsmöglichkeit, weshalb in dieser Arbeit die Aktivierung der Caspasen-Kaskade nur vereinzelt nachgewiesen werden konnte. Wieder andere

4 Diskussion

Studien legen die Vermutung nahe, dass es durch Carboplatin zur Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs kommt. Von diesem Signalweg war ursprünglich angenommen worden, dass er nach seiner Aktivierung das Zellüberleben fördert. Heute weiß man, dass nach Carboplatin-induzierten DNS-Schäden und Stabilisierung des p53-Proteins auch über anschließende Aktivierung der MAP-Kinase der programmierte Zelltod ausgelöst werden kann [78]. Neben den Caspasen gibt es also zahlreiche weitere Proteine, die im Rahmen der Apoptose-Induktion eine Rolle spielen und deren Detektion bei den SKOV-3- und BG1-Zellen Anlass für weitere Forschung wäre.

4.1.3 Modulation der NFκB-Aktivität

Bezüglich der pharmakologischen Wirkung von Carboplatin auf die Aktivierung des NFκB-Dimers liegen bei beiden Zelllinien bisher keine Daten vor, sodass auf Studien zu anderen Karzinomzelllinien zurückgegriffen werden muss.

In dieser Arbeit kann für die BG1-Zellen ein deutlicher Anstieg der NFκB-Aktivität nach Inkubation mit Carboplatin nachgewiesen werden.

Die Verknüpfung mit den Versuchen zum Apoptoseverhalten und der Zellzyklus-Modulation ist erschwert durch die Tatsache, dass dem Transkriptionsfaktor in gesunden Zellen neben einer proliferationsfördernden auch eine antiapoptotische Aktivität zugeschrieben wird [74]. Beides kann in dieser Arbeit für die BG1-Zellen nicht bestätigt werden, da Carboplatin hier zeit- und konzentrationsabhängig zur Apoptose führt. Allerdings beschreiben Arlt et al., dass in vielen Tumorzellen die physiologische, zeitlich limitierte Aktivierung des NFκB-Dimers aufgehoben und der Transkriptionsfaktor dauerhaft aktiviert ist [5]. So muss also die von uns in den BG1-Zellen detektierte Zunahme der NFκB-Aktivität nicht zwangsläufig an eine Steigerung der Proliferation und Inhibition von Apoptose geknüpft sein. Außerdem konnten neben Arlt et al. auch andere Arbeitsgruppen zeigen, dass diverse Chemotherapeutika die Aktivierung von NFκB selbst induzieren und so ihr eigenes zytotoxisches Potential reduzieren können mit nachfolgender Entstehung von Resistenzen [5] [53]. So könnte die Aktivierung des NFκB-Proteins in den BG1-Zellen durch Carboplatin also auch ein Hinweis auf die Entstehung einer Platinresistenz sein. Erwartet hätten wir einen solchen Zusammenhang eher für die SKOV-3-Zelllinie, die auf Inkubation mit dem Platinderivat kaum Einbußen der Zellvitalität zeigt. Hier bleibt jedoch die Aktivität des NFκB-Proteins unverändert. Da der Transkriptionsfaktor vielfältige Funktionen in der Zelle ausübt, wäre die Versuchsausweitung im Hinblick auf die Entstehung von Resistenzen und eine mögliche Korrelation mit dem NFκB-Dimer sinnvoll.

4 Diskussion

Dass Singh et al. für HEp-2-Zellen (Humane Epitheliom-Zellen) außerdem eine Downregulation des in den Tumorzellen dauerhaft aktivierten NFκB-Dimers durch die 24-stündige Inkubation mit Carboplatin beschrieben haben [77] zeigt, dass dieses Thema kontrovers diskutiert wird und abhängig vom Tumorzelltyp zu sein scheint.

Methodisch lässt sich diskutieren, ob neben der Ausweitung der Inkubationszeiträume und Konzentrationen zum Beispiel der EMSA als sensitivere Detektionsmethode besser geeignet wäre und Resultate mit deutlicherer Abstufung zwischen den einzelnen Ergebnissen erbringen würde.

4.2 Wirkung von Flavopiridol auf SKOV-3- und BG1-Zellen

4.2.1 Zellzyklusanalyse

Auch die Wirkung von Flavopiridol auf den Zellzyklus von SKOV-3- und BG1-Zellen ist zeit- und konzentrationsabhängig. Wie schon durch Carboplatin, kommt es auch unter Einfluss des Flavonoids zur Reduktion der Zellzahl in der G0/1-Phase. Während die SKOV-3-Zellen einen deutlichen Zellzyklusarrest in der S/G2-Phase zeigen, steigt bei den BG1-Zellen vor allem der avitale Zellanteil.

Diese bereits durch Song et al. beschriebenen Beobachtungen an Ovarialkarzinomzellen [79] können somit in dieser Arbeit teilweise reproduziert werden. Im Gegensatz dazu ist der von Shapiro dokumentierte Zellzyklusarrest sowohl in der G1-, als auch in der G2-Phase [75] nur teilweise reproduzierbar. Bei beiden Zelllinien kommt es sogar zur Abnahme der sich in der G0/1-Phase befindlichen Zellzahl.

Auch hier stellt sich die Frage, ob die durch CDK-Inhibitoren induzierte Modulation des Zellzyklus zwischen einzelnen Karzinomentitäten variiert. Um die genauen Abläufe im Rahmen der Zellzyklus-Arretierung der beiden Zelllinien SKOV-3 und BG1 durch Flavopiridol besser verstehen zu können, wäre die Detektion der einzelnen CDKs und Cycline mit deren zeitlicher Korrelation zu den verschiedenen Zellzyklus-Phasen eine sinnvolle Ergänzung.

4.2.2 Apoptoseinduktion

Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass Flavopiridol durch die Inhibition Cyklin-abhängiger-Kinasen ausschließlich inhibitorisch auf den Zellzyklus wirkt. Shapiro hingegen postulierte, dass es durch das Flavonoid zwar zunächst zur Arretierung des Zellzyklus kommt. Nach maximal 72 Stunden und deutlich höheren Dosen werde jedoch schließlich in vielen Tumorzellen die Apoptose eingeleitet [75]. Auch in dieser Arbeit zeigt sich bereits in den Konzentrationsreihen zur Zellzyklusanalyse bei beiden

4 Diskussion

Zelllinien mit steigender Inkubationsdauer von bis zu 48 Stunden eine deutliche Zunahme jener Zellen, die sich aufgrund verminderten DNS-Gehalts im Sub-G0/1-Peak darstellen und die apoptotische Fraktion repräsentieren. Shapiro wählte dabei mit bis zu 72 Stunden noch deutlich längere Inkubationszeiträume. Während das Flavonoid im Annexin-V-Assay analog zu den von Shapiro gemachten Beobachtungen die Vitalität der SKOV-3-Zellen nach 24 Stunden Inkubationsdauer erst in höheren Konzentrationen zu beeinflussen scheint, nimmt bei den BG1-Zellen auch schon in niedriger Dosierung die Zahl apoptotischer und nekrotischer Zellen zu.

Diverse Studien konnten zeigen, dass Flavopiridol weitere zytotoxische Eigenschaften besitzt, die nicht nur auf proliferierende Zellen beschränkt sind und der CDK-Inhibitor auch direkt den Tod zellzyklusaktiver wie -inaktiver Zellen induzieren kann. Neben Einflussnahme auf endotheliale Zellen zählen dazu auch die Effekte auf Zellzyklus-unabhängige CDK's, Nicht-CDK-Proteine oder die direkte Interaktion mit der DNS [66] [48] [18].

Li et al. beschreiben für Osteosarkom-Zellen nach Inkubation mit Flavopiridol die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C und anschließende Aktivierung von Caspase 8, 9 und der Effektor-Caspase 3 [54]. Diese Beobachtung kann für die BG1- und SKOV-3-Zellen in dieser Studie nur vereinzelt bestätigt werden. Da die Caspase 9 im Western Blot nicht darstellbar war, lässt sich über deren Expression oder Aktivierung keine Aussage treffen. Auch über die Freisetzung von Cytochrom C hat die Western Blot-Analyse keine verwertbaren Daten geliefert. Bei den SKOV-3-Zellen kann die Aktivierung der Caspase 8, trotz Zunahme der Apoptose-Fraktion im 1µmolaren Versuchsansatz (Annexin-V-Assay), nicht detektiert werden. Hingegen entspricht die Aktivierung der Caspase bei den BG1-Zellen nach 24 Stunden Inkubationsdauer den im Annexin-V-Assay gemachten Beobachtungen der steigenden Apoptose-Rate.

Beide Zelllinien zeigen, analog zum Annexin-V-Assay und den Beobachtungen Songs et al., mit zunehmender Inkubationsdauer und Konzentration des Flavonoids eine Abnahme der Procaspase 3. Dies spricht indirekt für deren Aktivierung und die Einleitung der Apoptose [79].

Die Apoptose-Induktion durch Flavopiridol und die Veränderungen auf molekularer Ebene scheinen, analog zur Zellzyklusmodulation, abhängig vom Zelltyp zu sein [18]. Für ein besseres Verständnis der molekularen Wirkmechanismen von Flavopiridol bei den SKOV-3- und BG1-Zellen, sind weitere Untersuchungen sinnvoll.

4 Diskussion

4.2.3 Modulation der NFκB-Aktivität

Für Flavopiridol konnte gezeigt werden, dass es die durch verschiedene Stimuli (zum Beispiel TNF, Wasserstoffperoxid, Zigarettenrauch) erfolgte NFκB-Aktivierung zeit- und dosisabhängig aufhebt [81]. Laut Takada wird dieser Effekt durch die Inhibition der Phosphorylierung des IκB-Proteins mit ausbleibender Ubiquitinierung und Degradierung des NFκB-Inhibitors vermittelt. Auch wird die Translokation des NFκB-Dimers in den Zellkern durch die Inaktivierung von im Zytosol vorliegender Kinasen verhindert. Neuere Studien zeigen hingegen, dass Flavopiridol zwar die Aktivität der DNS-Binderegion für den NFκB-Dimer inhibiert, jedoch entgegen vieler bisheriger Forschungsergebnisse, keinen Einfluss auf die Aktivierungskaskade des Transkriptionsfaktors hat [71].

Während bei den BG1-Zellen durch die starke Streuung der Ergebnisse keine Aussage zur Aktivierung des NFκB-Proteins gemacht werden kann, zeigen die SKOV-3-Zellen nach Inkubation mit Flavopiridol, entgegen bisheriger Untersuchungen, eine statistisch signifikante Zunahme der Aktivität des Transkriptionsfaktors. Dies widerspricht Schmerwitz' Theorie von der Aktivierung des DNS-Promoters ohne Beeinflussung der Aktivierungskaskade des NFκB-Dimers [71]. Bislang finden sich in der Literatur keine Daten über eine mögliche Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch Flavopiridol. Da diese Beobachtung eventuell abhängig von der Tumorzellentität ist, wären weitere Untersuchungen an den BG1- und SKOV-3-Zelllinien sinnvoll.

4.3 Wirkung von Proteasomen-Inhibitoren auf SKOV-3- und BG1-Zellen

4.3.1 Zellzyklusanalyse

Zum korrekten Ablauf des Zellzyklus ist die zyklische Expressierung der unterschiedlichen Cykline, gefolgt durch deren Abbau, von entscheidender Bedeutung. Proteasomen-Inhibitoren führen durch die Akkumulation von eigentlich zum Abbau bestimmter Proteine, wie auch der Cykline, zum nahezu kompletten Zellzyklusarrest [58]. Neben der Arretierung des Zellzyklus in der Metaphase der Mitose und am G1/S-Übergang, machte Machiels die Beobachtung, dass es konzentrationsabhängig auch zu einer Verlangsamung des Ablaufs der S-Phase kommt [58]. Dabei verwendete seine Arbeitsgruppe mit 2μmol, 11μmol und 54μmol tendenziell höhere Konzentrationen, verglichen mit dem Versuchsaufbau dieser Arbeit. Die von ihm verwendete Kombination der Anfärbung zum einen von aktiver DNS mit Bromdesoxyuridin, einem chemischen Analogon des Nukleosids Thymidin, und des

4 Diskussion

gesamten DNS-Gehalts mit Propidiumiodid, ermöglicht außerdem eine deutlichere Trennung zwischen den einzelnen Phasen des Zellzyklus. Zusätzlich kann mit der von uns durchgeführten Durchflusszytometrie und der DNS-Anfärbung mit Propidiumiodid lediglich eine Aussage über die Verteilung der Zellen an den einzelnen Zellzyklusphasen der Interphase getroffen werden. Es ist mit dieser Methode nicht möglich eine Arretierung der Zellteilung in der Mitose zu detektieren. Auch die von Machiels et al. postulierte Verlangsamung des Ablaufs der S-Phase ist mit diesem Versuchsaufbau nicht darstellbar. Dazu müsste man die Zellverteilung an den einzelnen Zellzyklusphasen an vielen eng beieinander liegenden Zeitpunkten bestimmen. Zum besseren Verständnis der molekularen Abläufe während der S-Phase und deren mögliche Blockierung durch Zytostatika wäre außerdem die Detektion aktiver und inaktiv an Histone gebundener DNS sinnvoll, ebenso die Suche nach weiteren Zellzyklus-regulatorischen Proteinen.

Der von Machiels et al. postulierte Zellzyklusarrest am Übergang von der G1- zur S-Phase kann ebenfalls nicht bestätigt werden [58]. Die Daten zeigen sogar eine Abnahme des Zellanteils bei beiden Zelllinien in der G0/1-Phase, während es simultan zum Arrest der Zellen in der S/G2-Phase kommt. Mit zunehmender Konzentration der Proteasomeninhibitoren akkumulieren schließlich die Zelltrümmer (Sub-G0/1). Bei der Datenanalyse ist die Aussagekraft durch das Zusammenfassen der S- und G2-Phase zur S/G2-Phase eingeschränkt und erschwert den Vergleich mit Daten anderer Arbeitsgruppen.

Die Resultate zur Zellzyklusmodulation von SKOV-3- und BG1-Zellen durch Proteasomen-Inhibitoren sind also nur sehr eingeschränkt mit den von Machiels et al. erhobenen Daten vergleichbar. In der Literatur finden sich jedoch diverse Hinweise darauf, dass die molekularen Vorgänge Zelltypabhängig zu sein scheinen. So kommt es bei manchen Ovarialkarzinomzelllinien durchaus zu einer Blockierung des Zellzyklus am Übergang von der G2- zur M-Phase nach Inkubation mit Proteasomen-Inhibitoren. Liu et. al. konnten dies sogar für SKOV-3-Zellen zeigen [55]. So wird neben den Cyclinen und CDK's auch die Beteiligung einer Reihe anderer Proteine am Zellzyklusarrest, induziert durch Proteasomeninhibitoren, diskutiert [58]. Nach Bazarro kommt es durch die Inaktivierung des Proteasoms auch zur Akkumulation von CDK-Inhibitoren und weiteren den Zellzyklus kontrollierenden Proteine [12].

Alternative Detektionsmethoden, die Analyse weiterer relevanter Proteine, sowie Versuchsansätze mit zusätzlichen Konzentrationen und Inkubationszeiträumen könnten weitere Aufschlüsse über die molekularen Vorgänge der Zellzyklus-Modulation

4 Diskussion

der SKOV3- und BG1-Zellen durch Inkubation mit Proteasomen-Inhibitoren geben. Auch scheinen sich die verschiedenen Proteasomen-Inhibitoren in ihrer Wirkstärke zu unterscheiden. So ist Bortezomib in der vorliegenden Form wesentlich potenter als das synthetische Analogon MG-115. Von diesem ist eine wesentlich höhere Dosierung nötig um vergleichbare Effekte zu erzielen. Dabei unterscheiden sich die beobachteten Konzentrationen um circa eine 1000er-Potenz.

4.3.2 Apoptoseinduktion

Durch die Hemmung der Proteasomen kommt es zur Akkumulation von zur Lyse bestimmten Proteinen [56]. Dies kann zum einen Zellzyklus-regulatorische Proteine betreffen, was zum Erliegen des Zellzyklus und anschließend zur Aktivierung der Apoptose führt [80]. Außerdem kann es durch Anreicherung Zellzyklus-unabhängiger regulatorischer Proteine zur direkten Einleitung des programmierten Zelltods kommen [30] [36]. Diese Beobachtung konnte für viele humane Karzinomzelllinien gemacht werden, scheinen jedoch abhängig vom Zelltyp zu sein.

Auch in unseren Versuchen zum Apoptoseverhalten humaner Ovarialkarzinomzellen zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den SKOV-3- und BG1-Zellen. Im direkten Vergleich lässt sich deutlich erkennen, dass die BG1-Zellen, analog zu Carboplatin und Flavopiridol, auch auf die Inkubation mit Bortezomib und MG-115 wesentlich empfindlicher reagieren. Während es bei den SKOV-3-Zellen nur zu einer leichten konzentrationsabhängigen Zunahme der apoptotischen Zellzahl kommt, reagieren die BG1-Zellen auf die gleiche Dosis der Proteasomen-Inhibitoren mit einem deutlichen Anstieg sowohl der Apoptose- als auch Nekroserate ($\alpha < 0,05$).

Diese Heterogenität von Tumorzellen stellt große Anforderungen an die Diagnostik und ist eine Herausforderung in der Entwicklung neuer zelltypspezifischer Therapiestrategien.

Von enormer Bedeutung ist die Aufklärung der verschiedenen Apoptose-Signalwege. Dabei werden die Mechanismen, durch die Chemotherapeutika Apoptose auslösen, weiterhin kontrovers diskutiert. So konnten Büning et al. in experimentellen Studien zeigen, dass Bortezomib bei SKOV-3-Zellen sowohl über prolongierten Zellzyklusarrest als auch ER-Stress zur Apoptose führt [17]. Auch andere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass es durch ER-Stress zu einem Ungleichgewicht der Zellhomöostase und schließlich zur Einleitung des programmierten Zelltods in Tumorzellen kommt. Die von Brüning et al. postulierte Apoptoseinduktion gehe dabei ohne signifikante Modulation der Expression anti-apoptotischer Proteine, wie XIAP oder Bcl-XI, einher.

4 Diskussion

Auch die Aktivität proapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie sei nicht wesentlich erhöht [17]. Diverse andere Arbeitsgruppen präsentieren jedoch Daten, die sehr wohl eine Hochregulierung und Aktivierung proapoptotischer Proteine wie Noxa, Bad oder Bax beschreiben mit teils simultaner Downregulation anti-apoptotisch wirkender Proteine [55] [21] [8]. Liu et al. konnten dies sogar für die SKOV-3-Zelllinie zeigen.

Während in dieser Arbeit mit der Western Blot-Analyse keine Daten zur Modulation von antiapoptotischen Proteinen erhoben wurde, kann bei den SKOV-3-Zellen die Cytochrom C-Freisetzung analog zu Brüning et al. ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Aufgrund fehlender Detektierbarkeit der Caspase 9 kann über die Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges keine Aussage getroffen werden.

Hingegen scheint es bei beiden Zelllinien, SKOV-3 wie auch BG1, durch die Inkubation mit Bortezomib zur Induktion von Apoptose über die extrinsische Signalkaskade zu kommen. Bei beiden Zelllinien kann eine zeit- und konzentrationsabhängige Aktivierung der Caspase 8 beobachtet werden mit simultaner Verminderung der Bandenstärke der inaktiven Proform der Caspase 3, was indirekt für deren Aktivierung spricht. Auch Bazarro konnte zeigen, dass es durch die Inaktivierung des Proteasoms zur Aktivierung der Caspase 3 mit anschließendem Zelltod kommt [12].

Ein Erklärungsversuch für die von Brüning et al. postulierte Apoptoseinduktion ohne signifikante Modulation anti- und proapoptotischer Proteine könnte die hohe Mutationsrate des p53-Proteins beim Ovarialkarzinom und die Apoptoseinduktion über alternative p53-unabhängige Signaltransduktionswege sein [17] [86]. Normalerweise führt das p53-Protein nicht nur zur vermehrten Synthese proapoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder, sondern es transloziert nach zytotoxischem Zellstress auch direkt in Richtung Mitochondrien und aktiviert den intrinsischen Signaltransduktionsweg mit nachfolgender Apoptose [83]. In bis zu 60% der fortgeschrittenen Ovarialkarzinome liegt eine Mutation dieses Tumorsuppressorproteins vor mit nachfolgender Akkumulation funktionsloser Proteine. Dieser Verlust des Wildtyp p53-Proteins scheint assoziiert mit erhöhter Wachstumsaggressivität der Tumore und gesteigerter Resistenz gegenüber Chemotherapeutika [41]. Auch die in dieser Arbeit untersuchte SKOV-3-Zelllinie ist für das Tumorsuppressorprotein p53 negativ. Dies würde auch die teils sehr unterschiedliche Reaktion der beiden Ovarialkarzinomzellen auf die Inkubation mit den zytotoxischen Medikamenten erklären. Die SKOV-3-Zellen zeigen sich in zahlreichen Experimenten deutlich widerstandsfähiger als die BG1-Zelllinie und es waren oft deutlich höhere Dosen der Substanzen nötig um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Letztendlich konnte aber auch bei den SKOV-3-Tumorzellen eine Zunahme der

4 Diskussion

Apoptoserate nachgewiesen werden. Damit wird die Aussagen Brünings et al. und Weinbergs unterstützt, dass noch weitere, p53-unabhängige Signaltransduktionswege bei der Apoptoseinduktion durch Proteasomeinhibitoren eine Rolle zu spielen scheinen [17] [86]. Die Arbeitsgruppe um Gatti konnte zeigen, dass Bortezomib in Kombination mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor ST2782 sowohl in platinsensiblen als auch p53-mutierten platinresistenten Ovarialkarzinomzelllinien zur Apoptose führt [35].

Nach wie vor sind viele der Apoptose-Signaltransduktions-Mechanismen noch immer unverstanden, werden kontrovers diskutiert und bedürfen weiterer Forschung.

4.3.3 Modulation der NFkB-Aktivität

Proteasomen-Inhibitoren verhindern durch die Inaktivierung des 26S-Proteasoms den Abbau des NFkB-Inhibitor-Proteins IκB und führen so zu einer Stabilisierung des inaktiv in Zytosol vorliegenden NFkB-Proteins [1]. Analog dazu konnte im ELISA tatsächlich ein unverändertes Aktivitätsniveau von NFkB nach Behandlung mit Bortezomib und MG-115 bei den SKOV-3-Zellen nachgewiesen werden. Durch diese Stabilisierung des inaktiv im Zytosol an seinen Inhibitor gebundenen Transkriptionsfaktors können Resistenzmechanismen überwunden werden, die durch die Aktivierung von NFkB, zum Beispiel durch die Behandlung mit Platinderivaten, entstanden sind. In Tumorzellen kann so die Sensitivität für Chemotherapeutika erhöht werden.

Für die BG1-Zellen kann bei starker Streuung der Ergebnisse keine Aussage getroffen werden.

Zur Bestimmung einer gar sinkenden Aktivität des NFkB-Dimers wäre die Wahl einer alternativen Detektionsmethode sinnvoller gewesen, da mit dem *TransAM NFkB Family Kit* nicht sicher zwischen ausbleibender Aktivierung und aktiver Stabilisierung der inaktiven Protein-Form des Transkriptionsfaktors unterschieden werden kann. So wäre eventuell der Nachweis der Akkumulation des NFkB-Inhibitor-Proteins nach Behandlung mit Proteasomen-Inhibitoren eine sinnvolle Ergänzung.

Es liegen jedoch auch Daten vor, bei denen die Behandlung mit Proteasomen-Inhibitoren nicht zur Inaktivierung, sondern zu einer Aktivierung des NFkB-Dimers führt. Dolcet konnte dies zum ersten Mal für Zellen eines Endometriumkarzinoms nachweisen. Dabei führte die Behandlung der Tumorzellen mit verschiedenen Proteasomeninhibitoren zur Phosphorylierung und Degradierung des NFkB-Inhibitor-Proteins, zur Aktivierung von NFkB und anschließendem Einleiten der Apoptose [29]. Für die beiden Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3 und BG1 liegen dazu bisher keine Daten vor.

Ob die Einleitung der Apoptose über die Aktivierung des NF κ B-Dimers oder dessen Inaktivierung abläuft, ist Gegenstand vieler Diskussionen und scheint einmal mehr abhängig vom Zelltyp, wie auch vom jeweiligen Triggerfaktor zu sein. Auch die Rolle des Transkriptionsfaktors in der Entstehung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika, ist nicht vollständig geklärt und bedarf weiterer Forschung. So bietet die Interaktion mit dem NF κ B-Protein, als Schaltstelle für viele wichtige Signaltransduktionswege in der Zelle, einen viel versprechenden Ansatz in der Entwicklung neuer Strategien der Tumorthherapie.

4.4 Synergismus durch Kombination zytotoxischer Substanzen?

Durch Kombination verschiedener Therapeutika miteinander erhofft man sich die Verträglichkeit der Therapie zu verbessern. Das Zusammenwirken der Substanzen führt im optimalen Falle zu einer gesteigerten oder neuartigen Wirkung bei verringerter Dosis der Einzelsubstanzen mit deutlich weniger Nebenwirkungen. Obwohl die in dieser Arbeit ausgewählten Substanzen mit ihren unterschiedlichen Wirkmechanismen die Voraussetzung für synergistische Wirkung erfüllen, spiegeln die Resultate der Experimente nach Kombination von Flavopiridol, Bortezomib und MG-115 mit Carboplatin sehr unterschiedliche Ergebnisse wieder. So lassen sich alle drei Wirkprinzipien von Substanzkombinationen nach Tallarida beobachten (siehe 1.8 [82]). Während es bei den BG1-Zellen durch die Inkubation mit Bortezomib und Carboplatin zu einem rein additiven Effekt in der Modulation des Zellzyklus kommt, bewirkt der Zusatz des Platinderivats zum CDK-Inhibitor Flavopiridol einen deutlichen konzentrationsabhängigen Synergismus. Neben einer Reduktion der G0/1-Zellzahl, nimmt hier vor allem die Rate apoptotischer Zellen (Sub-G0/1-Peak) signifikant zu ($\alpha < 0,05$). Bei den SKOV-3-Zellen zeigt sich durch die zusätzliche Behandlung mit Carboplatin bei den mit Bortezomib behandelten Zellen sogar ein statistisch signifikanter antagonistischer Effekt. Der Zusatz des Platinderivats scheint die zuvor mit der Reinsubstanz erzielten Resultate abzuschwächen. Da solch ein antagonistischer Effekt weitreichende Folgen in der klinischen Anwendung der Substanzkombination hätte, wäre dies ein Ansatzpunkt für die Durchführung weiterer Versuche zum Zellzyklusverhalten von Ovarialkarzinomzelllinien unter Behandlung mit Bortezomib und Carboplatin. Die Beurteilung der Zellzyklusmodulation nach Kombination von Carboplatin mit MG-115 ist durch teils sehr hohe Standardabweichungen nur eingeschränkt möglich.

4 Diskussion

Hatte man sich durch die Kombination von Flavopiridol und Proteasomen-Inhibitoren mit Carboplatin synergistische Effekte im Rahmen der Apoptoseinduktion erhofft, so zeigen die Versuche erneut sehr inhomogene Resultate. Auch zwischen den beiden Zelllinien BG1 und SKOV-3 variieren die Ergebnisse. Die von Baumann et al. gemachten Beobachtungen zu den beiden Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3 und BG1 können in dieser Studie reproduziert werden [11]. So kann durch die simultane Inkubation mit Carboplatin bei den mit Flavopiridol behandelten BG1-Zellen konzentrationsabhängig ein synergistischer Effekt bei der Induktion von Apoptose erzielt werden. Dies kann sowohl im Annexin-V-Assay als auch mittels Analyse von Apoptose-Faktoren im Western Blot nachgewiesen werden. Bei den SKOV-3-Zellen ist analog zu Baumann et al. [11] zwar ebenfalls eine Tendenz zur gesteigerten Apoptose durch die Kombination beider Substanzen erkennbar. Eine Aktivierung der Caspasen kann hier jedoch nicht nachgewiesen werden. In diesem Fall wäre die Einleitung des Zelltods über alternative Signaltransduktionswege zu diskutieren.

Auch in der Literatur variieren die Meinungen darüber, ob die Kombination von CDK-Inhibitoren mit anderen Substanzklassen zu einer Steigerung der Apoptoserate führt. Dies würde einen möglichen Therapieansatz in der Behandlung von soliden Tumoren darstellen [46] [60] [48]. Die zwischen verschiedenen Tumorzellentitäten stark variierenden Resultate verdeutlichen die Relevanz der Erforschung zelltypspezifischer Charakteristika und Signaltransduktionswege.

Nach simultaner Behandlung mit Bortezomib und Carboplatin zeichnet sich bei der BG1-Zelllinie durchflusszytometrisch noch eine rein additive Wirkung in der Zellzyklusmodulation und Induktion von Apoptose ab. Die anschließende Western Blot-Analyse hingegen zeigt einen Antagonismus nach Kombination beider Substanzen. Analog dazu lässt sich für die SKOV-3-Zellen sowohl durchflusszytometrisch als auch im Western Blot, ein eindeutig antagonistischer Effekt dokumentieren. Damit weichen die in dieser Studie erzielten Resultate deutlich ab von jenen Ergebnissen anderer präklinischer Studien. Bisher wurde kein Antagonismus durch die Kombination beider Substanzen beschrieben. Diverse Arbeitsgruppen konnten eine synergistische Wirkung von Bortezomib in Kombination mit platinhaltigen Substanzen bei Ovarialkarzinomzelllinien nachweisen [2] [1]. Kao et al. haben an Ovarialkarzinomzellen gar beobachtet, dass Bortezomib nicht nur zum Zelltod führt, sondern auch seine eigene Resistenzentstehung fördern kann. Sie konnten außerdem nachweisen, dass diese erworbene Resistenz durch den Zusatz von Platin überwunden werden kann [47].

4 Diskussion

Auch bei Zellen des Neuroblastoms fanden sich laut Armstrong et al. keine Hinweise für eine antagonistische Wirkung von Bortezomib mit Carboplatin. Jedoch verweist die Arbeitsgruppe ebenfalls auf die Variabilität der Ergebnisse zwischen verschiedenen Tumorzellentitäten und deren Signaltransduktionsmechanismen [6].

Ein Ansatzpunkt für weitere Forschung wären auch die von Dai et al. im Rahmen ihrer experimentellen Studie zur CML erworbenen Daten eines beobachteten Synergismus zwischen Bortezomib mit Flavopiridol [27]. Es wäre also nicht nur das in der Therapie des Ovarialkarzinoms etablierte Carboplatin ein viel versprechender Kombinationspartner. Auch die Kombination anderer Substanzen miteinander könnte einen neuen Ansatz in der Therapie des Ovarialkarzinoms darstellen.

Da die Caspase 9 im Western Blot nicht dargestellt werden kann, ist somit keine Aussage über die mögliche Aktivierung des mitochondrialen Signaltransduktionsweges möglich. Da außerdem die Identifikation proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom C im Western Blot fragliche Resultate geliefert hat, ist die Methodik kritisch zu betrachten und gegebenenfalls zu modifizieren. Dazu zählt neben der Durchführung der Zellkultur, Zellaufbereitung und Wahl der Antikörper auch die Durchführung des Western Blots.

Für alle in dieser Arbeit getesteten Medikamente wäre neben der Auswahl anderer Konzentrationen oder Inkubationszeiträume auch die sequentielle statt der simultanen Behandlung der Zellen zu diskutieren. Als Beispiel sei die Behandlung von Karzinomzellen mit Flavopiridol und Carboplatin genannt. Der CDK-Inhibitor inaktiviert eine Reihe von DNS-Reparaturmechanismen. Werden die Zellen außerdem mit Carboplatin versetzt, welches zur Vernetzung von DNS untereinander und mit umliegenden Proteinen führt, kommt es zum Zellzyklus-Arrest und Zelltod [46]. Bible et al. konnten zeigen, dass die Zytotoxizität von Flavopiridol in Kombination mit anderen Substanzen entscheidend vom Applikationsschema abhängt und deutlich erhöht war nach sequentieller Inkubation der Tumorzellen mit diversen Substanzen [13]. Dabei waren die applizierten Flavopiridol-Mengen vergleichbar mit den in dieser Studie ausgewählten Konzentrationen. Zur Bedeutung der Applikationsschemata zum Erzielen synergistischer Wirkung von Chemotherapeutika finden sich zahlreiche Studien. So haben auch Al-Eisawi et al. zeigen können, dass die Zugabe von Cisplatin zu Ovarialkarzinomzellen zwei Stunden nach verabreichtem Bortezomib zu deutlich stärkerem Zellsterben führte als die umgekehrte oder simultane Applikation [4].

Bereits 2002 haben Arlt et al. die Aufhebung der zeitlich limitierten Aktivierung des NfκB-Proteins in vielen Karzinomzellen beschrieben [5]. Durch die damit einhergehende kontinuierliche Aktivierung des Transkriptionsfaktors sei die eigentlich

4 Diskussion

proliferationsfördernde Funktion des Proteins aufgehoben. Es konnte sogar die Entstehung von Resistenzen gegen zytotoxische Substanzen beobachtet werden. Von diesen Medikamenten wiederum seien einige dazu in der Lage selbst das NfκB-Dimer im Zytosol zu aktivieren und so die Entstehung der eigenen Resistenz zu fördern [5]. Zu den SKOV-3- und BG1-Zellen liegen dazu bisher keine Daten vor.

Die Resultate des ELISA in dieser Arbeit variieren deutlich zwischen den beiden Ovarialkarzinomzelllinien. Eine generell erhöhte Grundaktivität des Transkriptionsfaktors, wie von Arlt beschrieben [5], kann bei beiden Zelllinien nicht detektiert werden. Jedoch kommt es bei den BG1-Zellen durch die zusätzliche Inkubation mit Carboplatin bei allen drei Ansätzen zu einer deutlichen, wenn auch nicht statistisch signifikanten Aktivitätssteigerung des NfκB-Proteins. Bei den SKOV-3-Zellen zeigen lediglich die mit Flavopiridol inkubierten Tumorzellen einen signifikanten Synergismus durch den Zusatz des Platinderivats.

Analog zu jenen Versuchen nach singulärer Applikation, lässt sich auch in den Kombinationsversuchen kaum ein möglicher Zusammenhang mit den Resultaten der Zellzyklusanalyse feststellen. In jenem Substanzgemisch aus Carboplatin mit Flavopiridol zeigen sich bei der Zellzyklusanalyse der SKOV-3-Zellen zu den Ansätzen der Reinsubstanzen unveränderte Resultate. Nach Inkubation mit Carboplatin und Bortezomib wurde gar eine antagonistische Wirkung beobachtet, wozu die Analyse der NfκB-Aktivität jedoch kein Korrelat liefert. Das Aktivitätslevel des Transkriptionsfaktors bleibt unverändert. Zwar kommt es bei den BG1-Zellen zu einer eindeutigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors in allen drei Kombinationsansätzen, jedoch existiert auch hier keine Korrelation zu den Resultaten der Zellzyklusanalyse. Die Ergebnisse der Zellzyklusmodulation nach zusätzlicher Inkubation mit Carboplatin sind rein additiv.

Auch die Beurteilung einer möglichen Korrelation der NfκB-Aktivität mit den Versuchsergebnissen zum Apoptoseverhalten nach Kombination der Medikamente ist schwierig. Die physiologische Form des NfκB-Proteins kontrolliert die Expression anti-apoptotischer Proteine und verhindert über die Inhibition der Caspasen-Kaskade die Apoptose [74]. Die mit Carboplatin und Flavopiridol inkubierten SKOV-3-Zellen hingegen zeigen sowohl eine deutliche Aktivitätssteigerung des Transkriptionsfaktors, als auch eine Tendenz zur Zunahme der Apoptose im Annexin-V-Assay. Außerdem lässt sich keine Verbindung zwischen dem durch die Kombination von Carboplatin mit Bortezomib resultierenden Antagonismus im Rahmen der Apoptose-Induktion und dem Ausbleiben der NfκB-Aktivierung ableiten. Die Resultate der BG1-Zelllinie sind

4 Diskussion

ebenfalls schwierig zu interpretieren. Alle drei Substanzkombinationen führen zu einer Steigerung der NfκB-Aktivität. Während jene Ansätze, die mit dem Platinderivat und Flavopiridol inkubiert wurden eine deutliche Zunahme der Apoptoserate aufweisen, zeigt die Kombination von Carboplatin und Bortezomib analog zur SKOV-3-Zelllinie sogar eine antagonistische Wirkung im Rahmen der Apoptoseinduktion.

In der Literatur liegen bislang keine Daten zur Aktivität des NfκB-Dimers nach Kombination von Carboplatin mit Flavopiridol vor. Aghajanian et al. jedoch konnten zeigen, dass es bei Zellen eines rezidivierenden Ovarialkarzinoms durch die zusätzliche Therapie mit Bortezomib zur Stabilisierung der inaktiven Form des NFκB-Proteins kommt. Die zuvor durch Carboplatin induzierten Resistenzmechanismen können so überwunden werden [2]. Für die beiden von uns verwendeten Ovarialkarzinomzelllinien BG1 und SKOV-3 kann dies jedoch nicht ohne weiteres reproduziert werden. Schon die Resultate der Einzelsubstanzen entsprechen nicht den von Aghajanian et al. gemachten Beobachtungen. So lassen auch die Resultate des ELISAs zur Detektion der NFκB-Aktivität nach Kombination der zytotoxischen Substanzen und deren möglicher Zusammenhang mit der Zellzyklusmodulation und Einleitung der Apoptose nur Raum für Spekulationen.

Eine Studie von Dai et al. zeigt an CML-Tumorzellen viel versprechende Resultate für die Kombination von Bortezomib mit CDK-Inhibitoren wie Flavopiridol [27]. Sie konnten mittels Annexin-V-Assay und Western Blot nachweisen, dass es durch die Kombination beider Substanzen zur mitochondrialen Dysfunktion mit nachfolgender Apoptose über die Inaktivierung der NFκB-Kaskade kommt. Während die dabei eingesetzten Substanzmengen mit den in dieser Arbeit verwendeten Dosierungen vergleichbar sind, reichte der Arbeitsgruppe eine Inkubationszeit von sechs Stunden um erste signifikante Resultate zu erzielen. Diskutiert werden kann außerdem, ob die Durchführung des EMSAs, wie auch die Arbeitsgruppe von Dai ihn angewandt hat, sinnvoller gewesen wäre und aussagekräftigere Ergebnisse erbracht hätte. Bislang liegen nur wenige Daten zur Modulation der NFκB-Aktivität bei Ovarialkarzinomzellen nach simultaner Behandlung verschiedener Medikamenten miteinander vor.

So gibt die genauere Typisierung von Tumorzellen, deren unterschiedliches Ansprechen auf die Inkubation mit zytotoxischen Substanzen und die Entstehung von möglichen Resistenzmechanismen Anreiz für weitere Experimente.

5 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist der gynäkologische Tumor mit der höchsten Mortalität und zählt weltweit zu den führenden Todesursachen der Frau. In den vergangenen Jahren haben sich die Therapieresultate der Kombination aus Tumorentfernung mit anschließender Chemotherapie wesentlich verbessert. Dennoch erleiden über 60% der Patientinnen ein Rezidiv und versterben. Problematisch ist hierbei die Entstehung von Resistenzen gegen die platinhaltige Chemotherapie. Durch den Einsatz alternativer Substanzen oder die Kombination von Medikamenten verschiedener Wirkstoffklassen können sich ausbildende Resistenzen überwunden werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden an den beiden Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3 und BG1 neben dem bereits in der Therapie etablierten Carboplatin die Proteasomen-Inhibitoren Bortezomib und MG-115 und der CDK-Inhibitor Flavopiridol mittels Durchflusszytometrie auf ihre antiproliferative Wirkung untersucht. Dabei konnte im Rahmen der Zellzyklusanalyse und des Annexin-V-Assays für alle vier Medikamente eine zeit- und konzentrationsabhängige antiproliferative Wirkung nachgewiesen werden. Es kommt zum Zellzyklusarrest in der S/G2-Phase und schließlich zum Absterben der Tumorzellen. Ausnahme sind die SKOV-3-Zellen, deren Vitalität unter Behandlung mit Carboplatin unverändert bleibt.

Da die Signaltransduktionswege der Apoptose mögliche Angriffspunkte in der modernen Tumorthherapie darstellen, wurden aus den beiden Hauptsignalwegen exemplarisch Proteine ausgewählt, deren Detektion mittels Western Blot über eine mögliche Aktivierung durch die Medikamente Auskunft geben soll. Während bei beiden Zelllinien die zeit- und konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion über den extrinsischen Weg durch Bortezomib nachgewiesen werden kann, gelingt dies nach Inkubation mit Flavopiridol lediglich bei den BG1-Zellen. Unklar bleibt, ob es sich bei der vereinzelt nachgewiesenen Aktivierung von Caspase 8 (SKOV-3 und BG1) und Caspase 3 (BG1) nach 16-stündiger Carboplatin-Behandlung um signifikante Ergebnisse handelt oder lediglich um Ausreißer innerhalb der Messreihe. Über eine mögliche Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges kann wegen mangelnder Detektierbarkeit spezifischer Proteine keine Aussage getroffen werden.

Neben der Wirkung der Reinsubstanzen auf die beiden Ovarialkarzinomzelllinien wurde der Frage nach einem möglichen Synergismus von Flavopiridol und den Proteasomeninhibitoren in Kombination mit Carboplatin nachgegangen. So lassen sich in den Versuchen alle drei Wirkprinzipien von Substanzkombinationen beobachten.

5 Zusammenfassung

Während bei der BG1-Zelllinie die Kombination von Flavopiridol mit Carboplatin konzentrationsabhängig eine signifikant synergistische antiproliferative Wirkung zeigt, deutet sich bei den SKOV-3-Zellen lediglich eine Zunahme der Apoptose an, wozu jedoch der Western Blot kein Korrelat liefert. In diesem Fall wäre die Apoptose-Einleitung über alternative Signaltransduktionswege zu diskutieren. Nach simultaner Behandlung mit Bortezomib und Carboplatin lässt sich bei der SKOV-3-Zelllinie, sowohl durchflusszytometrisch als auch im Western Blot, ein deutlich antagonistischer Effekt dokumentieren. Während sich bei den BG1-Zellen in den Versuchen mittels Durchflusszytometrie noch eine rein additive Wirkung in der Zellzyklusmodulation und Induktion von Apoptose durch den Zusatz von Carboplatin zum Proteasomeninhibitor Bortezomib abzeichnet, zeigt die Western Blot-Analyse einen deutlichen Antagonismus. Da diese unterschiedlichen Wirkprinzipien weitreichende Folgen in der klinischen Anwendung von Substanzkombinationen haben, wären die Resultate dieser Studie ein Anlass für die Durchführung weiterer Experimente zum Zellzyklus- und Apoptoseverhalten von Ovarialkarzinomzelllinien.

Als Schaltstelle vieler Signaltransduktionswege in der Zelle bietet die Interaktion mit dem NFκB-Protein einen viel versprechenden Ansatz in der Entwicklung neuer Strategien der Tumorthherapie. Mittels ELISA wurde deshalb dessen Aktivität im Zytosol beider Karzinomzelllinien nach Inkubation mit den vier Substanzen untersucht. Während sich bei den BG1-Zellen eine Zunahme der NfκB-Aktivität sowohl durch Carboplatin als Reinsubstanz, wie auch in Kombination mit Flavopiridol und den beiden Proteasomen-Inhibitoren abzeichnet, kommt es bei den SKOV-3-Zellen lediglich durch Flavopiridol zu einer signifikanten Modulation des Aktivitätslevels. Auch nach Kombination mit Carboplatin zeigt nur jener mit Flavopiridol inkubierte SKOV-3-Ansatz einen signifikanten Synergismus durch den Zusatz des Platinderivats. Die Datenlage zum möglichen Zusammenhang von Zellzyklus und Apoptose mit der Aktivität des Transkriptionsfaktors ist keineswegs eindeutig. Wie die Resultate dieser Arbeit andeuten, scheinen die durch Carboplatin, Flavopiridol und die beiden Proteasomen-Inhibitoren induzierten Veränderungen des Zellstoffwechsels abhängig vom Zelltyp zu sein. Deshalb wäre die genauere Typisierung von Tumorzellen Anlass für weitere Experimente. Da die Zytotoxizität mancher Substanzen entscheidend vom Applikationsschema abhängig zu sein scheint, wäre neben der Versuchsausweitung auf weitere Konzentrationen und Inkubationszeiträume auch die Wahl des Applikationsschemas zu diskutieren.

5 Zusammenfassung

Weiterführende Untersuchungen sollten sich auf alternative Apoptose-Signaltransduktionswege und die Entstehung möglicher Resistenzmechanismen konzentrieren, um neue Strategien in der Behandlung des Ovarialkarzinoms aufzuzeigen.

6 Abstract

Ovarian cancer is one of the leading causes of death among women worldwide and has the highest mortality rate of all gynecologic cancer types. Even though the combination of surgery and subsequent chemotherapy has improved therapy results in recent years, more than 60% of all patients relapse and die. One of the biggest challenges in treating ovarian cancer is the development of platinum resistance. One approach to overcome resistance is the application of alternative substances or the combination of various drugs acting by different mechanisms.

In this study we examined the antiproliferating effect of carboplatin, which is already established in ovarian carcinoma as the first line therapy, as well as the proteasome-inhibitors bortezomib, MG-115 and the CDK-inhibitor flavopiridol using ovarian carcinoma cell lines like SKOV-3 and BG1. Cell cycle-analysis and apoptosis-assay show time- and dose-dependent antiproliferating effect for all four drugs. Except for SKOV3-cells, whose vitality does not change under carboplatin application, tumour cells arrest in the S/G2-phase of cell cycle and eventually die off.

Signal transduction pathways of apoptosis are potential working points in modern tumour-therapy. Exemplary proteins from both main pathways of apoptosis were selected, whose detection in western blot provides information on the potential activation of the apoptosis cascade. While both cell lines show a time- and dose-dependent induction of apoptosis via the extrinsic pathway after treatment with bortezomib, the effectiveness of flavopiridol can only be established for BG1-cells.

It remains unclear, whether the occasional detected activation of caspase 8 in both cell lines and caspase 3 in BG1 cell line after 16 hours treatment with carboplatin were a significant modification or only an anomaly within the measurement series. Due to the lacking detectability of specific proteins in western blot, no conclusion could be drawn regarding a possible activation of the intrinsic apoptotic pathway.

Apart from effects of pure substances on tumour cells potential synergies of flavopiridol and proteasome-inhibitors with carboplatin were analysed. Here, all three active principles of substance combination described by Tallarida could be observed. While for BG1-cells a significant dose-dependent synergistic antiproliferating effect after incubation with both flavopiridol and carboplatin was detected, the SKOV-3-cell line only showed a tendency of increasing apoptosis without any correlate in western blot analysis. In this regard, we suggest further examining the activation of apoptosis by alternative signal transduction ways in SKOV-3-cells.

After simultaneous treatment with bortezomib and carboplatin an antagonistic effect on SKOV-3-cells by means of flowcytometry as well as western blot analysis can be demonstrated. Flowcytometry detected only an additive effect of a combined application of bortezomib with carboplatin on modulation of cell cycle and induction of apoptosis in BG1-cells. However, analysis of caspase-activity using western blot indicated an antagonistic effect. These varying principles of action have extensive consequences for clinical application of substance combinations in anti-cancer therapy, and the results of this study could be a starting point for further analysis of the modulation of cellcycle and apoptosis in ovarian cancer.

As a switchpoint of many signal transduction pathways in cells, the interaction with NFkB seems to provide a promising approach for the development of new strategies in tumour therapy. Via ELISA, we investigated the activity of the NFkB-protein in cytoplasma of ovarian cancer cell lines after incubation with carboplatin, flavopiridol and proteasome inhibitors. While both single agent carboplatin as well as a combination of carboplatin with flavopiridol and proteasome-inhibitors in BG1-cells lead to increasing activity of Nfkb, only the treatment with flavopiridol showed a significant modulation for the case of SKOV-3-cells. However, the combined application of flavopiridol with carboplatin yields a significant synergistic effect. The available literature referring to the correlation of cellcycle and apoptosis with the level of activity of Nfkb is by no means unambiguous. As the results of this study suggest, the modifications induced by carboplatin, flavopiridol and proteasome inhibitors depend on the respective celltype. In this respect, the typing of tumour cells and their diverging response to cytotoxic drugs constitutes an interesting potential for further research. Furthermore, available data indicate that the cytotoxic capability of drugs is linked to the sequence of application. Therefore, apart from an expansion of trials with additional doses and time-panels, the choice of different sequences of application should be discussed. Further tests should focus on alternative ways of apoptosis and the development of mechanisms of resistances in order to identify new strategies in tumour therapy.

7 Literaturangaben

- [1] Aghajanian C, Dizon D, Sabbatini P, Raizer J, Dupont J, Spriggs D. Phase I Trial of Bortezomib and Carboplatin in Recurrent Ovarian or Primary Peritoneal Cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 5943-9.
- [2] Aghajanian C. Clinical update: Novel targets in gynecologic malignancies. *Semin Oncol.* 2004; 31: 22-6
- [3] Ahn H, Kim Y, Kim J, Han S, Shin J, Yang H. Mechanism of taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian carcinoma cells. *J Cell Biochem.* 2004; 91: 1043-52.
- [4] Al-Eisawi Z, Beale P, Chan C, Yu J, Huq F. Modulation of cisplatin cytotoxicity due to its combination with bortezomib and the nature of its administration. *Anticancer Res.* 2011; 31: 2757-62.
- [5] Arlt A, Schaefer H. NFkappaB-dependent chemoresistance in solid tumors. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2002; 40 :336-47.
- [6] Armstrong M, Schumacher K, Mody R, Yanik G, Opipari AJ, Castle V. Bortezomib as a therapeutic candidate for neuroblastoma. *J Exp Ther Oncol.* 2008; 7: 135-45.
- [7] Banerjee S, Gore M. The Future of Targeted Therapies in Ovarian Cancer. *Oncologist.* 2009; 14: 706-16.
- [8] Bast R. Status of Tumor Markers in Ovarian Cancer Screening. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 200s-205s.
- [9] Bast RJ, Xu F, Yu Y, Barnhill S, Zhang Z, Mills G. CA 125: the past and the future. *Int J Biol Markers.* 1998; 13: 179-87.
- [10] Batzler W, Giersiepen K, Hentschel S, Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A et al. Krebs in Deutschland 2003 – 2004 Häufigkeiten und Trends. 2008. 6 ed. Robert Koch-Institut, Berlin
- [11] Baumann K, Kim H, Rinke J, Plaum T, Wagner U, Reinartz S. Effects of alvocidib and carboplatin on ovarian cancer cells in vitro. *Exp Oncol.* 2013; 35: 168-73.
- [12] Bazzaro M, Lee MZA, Stirling W, Santillan A, Shih I, Roden R. Ubiquitin-proteasome system stress sensitizes ovarian cancer to proteasome inhibitor-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2006; 66: 3754-63.
- [13] Bible K, Kaufmann S. Cytotoxic synergy between flavopiridol and various antineoplastic agents: importance of sequence of administration. *Cancer Res.* 1997; 57: 3375-80.
- [14] Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol Rep.* 2003; 10: 1663-82.
- [15] Boyd J, Rubin S. Hereditary Ovarian Cancer: Molecular Genetics and Clinical

Implications. *Gynecol Oncol.* 1997; 64: 196-206.

[16] Bruening A, Mylonas I. New emerging drugs targeting the genomic integrity and replication machinery in ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 2011; 283: 1087-96.

[17] Bruening A, Burger P, Vogel M, Rahmeh M, Frieze K, Lenhard M et al. Bortezomib treatment of ovarian cancer cells mediates endoplasmic reticulum stress, cell cycle arrest, and apoptosis Bortezomib treatment of ovarian cancer cells mediates endoplasmic reticulum stress, cell cycle arrest, and apoptosis. *Invest New Drugs.* 2009; 27: 543-51.

[18] Bruesselbach S, Nettelbeck D, Sedlacek H, Mueller R. Cell cycle-independent induction of apoptosis by the anti-tumor drug. *Int J Cancer.* 1998;77: 146-52.

[19] Budihardjo I, Holt O, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999; 15: 269-90.

[20] Burger R, Brady M, Bookman M, Fleming G, Monk B, Huang H, et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2011; 365: 2473-83.

[21] Chen D, Frezza M, Schmitt S, Kanwar J, Dou Q. Bortezomib as the First Proteasome Inhibitor Anticancer Drug: Current Status and Future Perspectives. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011;11: 239-53.

[22] Christian B, Grever M, Byrd J, Lin T. Flavopiridol in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Oncol.* 2007; 19: 573-8.

[23] Cohen G. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997; 326: 1-16.

[24] Colombo P, Mourregot A, Fabbro M, Gutowski M, Saint-Aubert B, Quenet F et al. Aggressive surgical strategies in advanced ovarian cancer: a monocentric study of 203 stage IIIC and IV patients. *Eur J Surg Oncol.* 2009;35: 135-43.

[25] Cory A, Chen J, Cory J. Effects of PRIMA-1 on Wild-type L1210 Cells Expressing Mutant p53 and Drug-resistant L1210 Cells Lacking Expression of p53: Necrosis vs. Apoptosis. *Anticancer Res.* 2006; 26: 1289-95.

[26] Cruet-Hennequart S, Villalan S, Kaczmarczyk A, O'Meara E, Sokol A, Carty M. Characterization of the effects of cisplatin and carboplatin on cell cycle progression and DNA damage response activation in DNA polymerase eta-deficient human cells. *Cell Cycle.* 2009; 8: 3039-50.

[27] Dai Y, Rahmani M, Pei X, Dent P, Grant S. Bortezomib and flavopiridol interact synergistically to induce apoptosis in chronic myeloid leukemia cells resistant to imatinib mesylate through both Bcr/Abl-dependent and -independent mechanisms. *Blood.* 2004; 104: 509-18.

- [28] Wagner U, Harter P, Hilpert F, Mahner S, Reuß A, du Bois A et al. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe. 2013.
- [29] Dolcet X, Llobet D, Encinas M, Pallares J, Cabero A, Schoenenberger J et al. Proteasome inhibitors induce death but activate NF-kappaB on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants. *J Biol Chem.* 2006; 281: 22118-30.
- [30] Dou Q, McGuire T, Peng Y, An B. Proteasome Inhibition Leads to Significant Reduction of Bcr-Abl Expression and Subsequent Induction of Apoptosis in K562 Human Chronic Myelogenous Leukemia Cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 289: 781-90.
- [31] Evan G, Vousden K. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature.* 2001; 411: 342-8.
- [32] Fischer U, Schulze-Osthoff K. New Approaches and Therapeutics Targeting Apoptosis in Disease. *Pharmacol Rev.* 2005; 57: 187-215.
- [33] Foti C, Demarchi F, Brancolini C. Inhibitors of the ubiquitin-proteasome system are not all alike. *Autophagy.* 2009; 5: 543-5.
- [34] Fung-Kee-Fung M, Oliver T, Elit L, Oza A, Hirte H, Bryson P. Optimal chemotherapy treatment for women with recurrent ovarian cancer. *Curr Oncol.* 2007; 14: 195-208.
- [35] Gatti L, Benedetti V, De Cesare M, Corna E, Cincinelli R, Zaffaroni N et al. Synergistic interaction between the novel histone deacetylase inhibitor ST2782 and the proteasome inhibitor bortezomib in platinum-sensitive and resistant ovarian carcinoma cells. *J Inorg Biochem.* 2012; 113: 94-101.
- [36] Gazos Lopes U, Erhardt P, Yao R, Cooper G. p53-dependent Induction of Apoptosis by Proteasome Inhibitors. *J Biol Chem.* 1997; 272: 12893-6.
- [37] Gerschenson L, Rotello R. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J.* 1992; 6: 2450-5.
- [38] Goff B, Mandel L, Melancon C, Muntz H. Frequency of Symptoms of Ovarian Cancer in Women Presenting to Primary Care Clinics. *JAMA.* 2004; 291: 2705-12.
- [39] Greimel E, Bjelic-Radisic V, Pfisterer J, Hilpert F, Daghofer F, du Bois A. Randomized Study of the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group Comparing Quality of Life in Patients With Ovarian Cancer Treated With Cisplatin/Paclitaxel Versus Carboplatin/Paclitaxel. *J Clin Oncol.* 2006 ; 24: 579-86.
- [40] Hankinson S, Hunter D, Colditz G, Willett W, Stampfer M, Rosner B et al. Tubal

- Ligation, Hysterectomy, and Risk of Ovarian Cancer. *JAMA*. 1993; 270: 2813-8.
- [41] Havrilesky L, Darcy M, Hamdan H, Priore R, Leon J, Bell J et al. Prognostic significance of p53 mutation and p53 overexpression in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 3814-25.
- [42] Huwe A, Mazitschek R, Giannis A. "Small Molecules as Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases," *Angewandte Chemie, International Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim. Angew Chem Int Ed Engl*. 2003;42: 2122-38.
- [43] Jaeger W, Gehring E, Hagenauer B, Aust S, Senderowicz A, Thalhammer T. Biliary excretion of flavopiridol and its glucuronides in the isolated perfused rat liver: role of multidrug resistance protein 2 (Mrp2). *Life Sci*. 2003; 73: 2841-54.
- [44] Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61: 69-90.
- [45] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun M. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009; 59: 225-49.
- [46] Johnson N, Shapiro G. Cyclin-dependent kinases (cdks) and the DNA damage response: rationale for cdk inhibitor-chemotherapy combinations as an anticancer strategy for solid tumors. *Expert Opin Ther Targets*. 2010; 14: 1199-212.
- [47] Kao C, Chao A, Tsai C, Lin C, Chuang W, Chen H et al. Phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 1 reduces bortezomib-mediated apoptosis in cancer cells. *Cell Death Dis*. 2013; 4: 512.
- [48] Kelland L. Flavopiridol, the first cyclin-dependent kinase inhibitor to enter the clinic: current status. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000; 9: 2903-11
- [49] Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26: 239-57.
- [50] Kim H, Park N, Chung H, Kim J, Song Y, Kang S. Significance of preoperative serum CA-125 levels in the prediction of lymph node metastasis in epithelial ovarian cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008; 87: 1136-42.
- [51] Kitada N, Takara K, Itoh C, Minegaki T, Tsujimoto M, Sakaeda T, Yokoyama T. Comparative analysis of cell injury after exposure to antitumor platinum derivatives in kidney tubular epithelial cells. *Chemotherapy*. 2008; 54: 217-23.
- [52] Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri E, Baehrecke E et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 2009; 16: 3-11
- [53] Lagunas V, Meléndez-Zajgla J. Nuclear Factor-kappa B as a Resistance Factor to Platinum-Based Antineoplastic Drugs. *Met Based Drugs*. 2008; 2008: 576104.

- [54] Li Y, Tanaka K, Li X, Okada T, Nakamura T, Takasaki M et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor, flavopiridol, induces apoptosis and inhibits tumor growth in drug-resistant osteosarcoma and Ewing's family tumor cells. *Int J Cancer*. 2007; 121: 1212-8.
- [55] Liu Z, MA N, Jiang Z, Yang G, Wang J, Zhao D. The experimental study of bortezomib induce ovarian cancer SKOV-3, SKOV-3/DDP cell proliferation and drug resistance reversion. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2011; 29
- [56] Ludwig H, Drach J. Arzneimittelprofil Bortezomib. *Arzneimittelprofil Onkologie* 2009; 1-15
- [57] Lynch H, Casey M, Snyder C, Bewtra C, Lynch J, Butts M, Godwin A. Hereditary Ovarian Cancer: Molecular Genetics, Pathology, Management, and Heterogeneity. *Mol Oncol*. 2009; 3: 97-137.
- [58] Machiels B, Henfling M, Gerards W, Broers J, Bloemendal H, Ramaekers F, Schutte B. Detailed Analysis of Cell Cycle Kinetics Upon Proteasome Inhibition. *Cytometry*. 1997; 28: 243-52.
- [59] Maddocks K, Lin T. Update in the management of chronic lymphocytic leukemia. *J Hematol Oncol*. 2009; 2:29.
- [60] Mayer F, Mueller S, Malenke E, Kuczyk M, Hartmann J, Bokemeyer C. Induction of apoptosis by flavopiridol unrelated to cell cycle arrest in germ cell tumour derived cell lines. *Invest New Drugs*. 2005; 23: 205-11.
- [61] Meijer L, Leclerc S, Leost M. Properties and potential-applications of chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Pharmacol Ther*. 1999;82: 279-84.
- [62] Morice P, Joulie F, Camatte S, Atallah D, Rouzier R, Pautier P et al. Lymph node involvement in epithelial ovarian cancer: analysis of 276 pelvic and paraaortic lymphadenectomies and surgical implications. *J Am Coll Surg*. 2003; 197: 198-205.
- [63] Permuth-Wey J, Sellers T. Epidemiology of ovarian cancer. *Methods Mol Biol*. 2009; 472: 413-37.
- [64] Perren T, Swart A, Pfisterer J, Ledermann J, Pujade-Lauraine E, Kristensen G et al. A Phase 3 Trial of Bevacizumab in Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 2011; 365: 2484-96.
- [65] Pfizer Corporation Austria. Carboplatin „Pfizer“ CS 150mg-Konzentrat zur Infusionsbereitung. 2013
- [66] Phillips A, Vousden K. E2F-1 induced apoptosis. *Apoptosis*. 2001; 6: 173-82.
- [67] Post P, Casparie M, Blaauwgeers J, De Blok S. Reduced risk of ovarian cancer after hysterectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2005; 84: 1024

- [68] Preiß J, Dornoff W, Hagmann F, Schmieder A. "Taschenbuch Onkologie 2010/2011" W. Zuckschwerdt Verlag. 2010; 15: 289-290; 332
- [69] Ramaswamy B, Phelps M, Baiocchi R, Bekaii-Saab T, Ni W, Lai J et al. A dose-finding, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of a novel schedule of flavopiridol in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*. 2012; 30: 629-38.
- [70] Reed E, Kohn E, Sarosy G, Dabholkar M, Davis P, Jacob J, Maher M. Paclitaxel, cisplatin, and cyclophosphamide in human ovarian cancer: molecular rationale and early clinical results. *Semin Oncol*. 1995; 22: 90-6.
- [71] Schmerwitz U, Sass G, Khandoga A, Joore J, Mayer B, Berberich N et al. Flavopiridol protects against inflammation by attenuating leukocyte-endothelial interaction via inhibition of cyclin-dependent kinase 9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31: 280-8.
- [72] Sehoulia J, Stengelc D, Oskaya G, Blohmerb J, Kaubitzschd S, Lichteneggera W. Dose Finding Study for Combination Treatment with Topotecan and Gemcitabine of Patients with Recurrent Ovarian Cancer after Failure of First-Line Chemotherapy with Paclitaxel and Platinum. *Onkologie*. 2004; 27: 58-64.
- [73] Serov S, Scully R. International Histological Classification of Tumours, No. 9 Histopathological typing of ovarian tumours. World Health Organisation, Geneva. 1973.
- [74] Sethi G, Sung B, Aggarwal B. Nuclear Factor-kappa B Activation: From Bench to Bedside. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008; 233: 21-31.
- [75] Shapiro G. Preclinical and Clinical Development of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Flavopiridol. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 4270s-4275s.
- [76] Sharma R, Graham J, Mitchell H, Brooks A, Blagden S, Gabra H. Extended weekly dose-dense paclitaxel/carboplatin is feasible and active in heavily pre-treated platinum-resistant recurrent ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2009; 100: 707-12.
- [77] Singh S, Bhat M. Carboplatin induces apoptotic cell death through downregulation of constitutively active nuclear factor-kappaB in human HPV-18 E6-positive HEp-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 318: 346-53.
- [78] Singh S, Kumar Upadhyay A, Kumar Ajay A, Kumar Bhat M. p53 regulates ERK activation in carboplatin induced apoptosis in cervical carcinoma: A novel target of p53 in apoptosis. *FEBS Lett*. 2007; 581: 289-95.
- [79] Song Y, Shen K, Tang P. Therapeutic effect of flavopiridol, a small molecular cyclin-dependent kinase inhibitor, in human ovarian carcinoma. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2007; 42: 761-4.

- [80] Sterz J, von Metzler I, Hahne J, Lamottke B, Rademacher J, Heider U et al. The potential of proteasome inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008; 17:879-95.
- [81] Takada Y, Aggarwal B. Flavopiridol Inhibits NF-kappaB -Activation Induced by Various Carcinogens and Inflammatory Agents through Inhibition of I κ Ba-Kinase and p65 Phosphorylation. *J Biol Chem*. 2004; 279: 4750-9.
- [82] Tallarida R. Drug Synergism: Its Detection and Applications. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 298: 865-72.
- [83] Vaseva A, Moll U. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1787: 414-20.
- [84] Wagstaff A, Ward A, Benfield P, Heel R. Carboplatin: A Preliminary Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Cancer. *Drugs*. 1989; 37: 162-90.
- [85] Wang L, Ren D. Flavopiridol, the first cyclin-dependent kinase inhibitor: recent advances in combination chemotherapy. *Mini Rev Med Chem*. 2010; 10: 1058-70.
- [86] Weinberg R. The biology of cancer, New York, NY [u.a.]: GS Garland Science, 2007. 1: 255-356
- [87] Wolf B, Green D. Suicidal Tendencies: Apoptotic Cell Death by Caspase Family Proteinases. *J Biol Chem*. 1999; 274: 20049-52.
- [88] Xiong X, Sui MFW, Kraft A. Cell Cycle Dependent Antagonistic Interactions between Paclitaxel and Carboplatin in Combination Therapy. *Cancer Biol Ther*. 2007; 6:1067-73.

8 Anhang

8.1 TNM-Einteilung und FIGO-Stadien des Ovarialkarzinoms

T-Stadien	FIGO	
Tx		Primärtumor nicht beurteilbar
T0		kein Hinweis auf Primärtumor
Tis		Karzinom in situ
T1	I	Tumor begrenzt auf Ovarien
	a	auf ein Ovar begrenzt, Kapsel intakt
	b	auf beide Ovarien begrenzt, Kapsel intakt
	c	auf Ovarien begrenzt mit Kapselruptur und/oder an Ovaroberfläche und/oder maligne Zellen in Aszites
T2	II	Ausdehnung im kleinen Becken
	a	Uterus und/oder Tuben(n)
	b	andere Beckengewebe
	c	im Becken und maligne Zellen in Aszites
T3 u/o N1,2	III	Ausdehnung in Peritonealhöhle außerhalb des Beckens und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
	a	mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
	b	Peritonealmetastasen <2cm jenseits des Beckens
T3c u/o N1,2	c	Peritonealmetastasen >2cm jenseits des Beckens und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
T3c u/o M1	IV	Fernmetastasen
Regionale Lymphknoten (N-Stadium)		
Nx		regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
N0		keine lokoregionären Lymphknotenmetastasen
N1		Nachweis regionalen Lymphknotenbefalls
Fernmetastasen (M-Stadium)		
Mx		Beurteilung des Vorhandenseins von Fernmetastasen nicht möglich
M0		kein Nachweis von Fernmetastasen
M1		Vorhandensein von Fernmetastasen

8.2 Abkürzungsverzeichnis

BRC 1+2	BReast Cancer-gene 1+2 = Brustkrebsgene 1+2
(d)ATP	(Desoxy) Adenosintriphosphat
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMSA	electromobility shift assay
FACS	fluorescence-activated cell sorting, =Durchflusszytometrie
FIGO	Federation Internationale de Gynecology et de l'Obstetrique
GTP	Guanosintriphosphat
HPV	Humanes Papillomvirus
MAP	engl. mitogen-activated protein
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PARP	Poly (ADP-ribose) Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
TNF(R)	Tumornekrosefaktor (Rezeptor)
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WHO	World health organisation = Weltgesundheitsorganisation

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	zielgerichtete Therapeutika	4
Abb. 2	Die Phasen des Zellzyklus	9
Abb. 3	Paarung der Cykline mit den komplementären CDKs	10
Abb. 4	Fluktuation der Cyklin-Konzentration während des Zellzyklus	10
Abb. 5	CDK-Inhibition durch Flavopiridol	11
Abb. 6	Hauptsignaltransduktionswege der Apoptose	14
Abb. 7	Darstellung Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie	32
Abb. 8	Darstellung Annexin-V-Assay mittels Durchflusszytometrie	35
Abb. 9	Prinzip des Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	45
Abb. 10	Zellzyklusmodulation durch Carboplatin bei SKOV-3-Zellen	47
Abb. 11	Zellzyklusmodulation durch Carboplatin bei BG1-Zellen	47
Abb. 12	Zellzyklusmodulation durch Flavopiridol bei SKOV-3-Zellen	48
Abb. 13	Zellzyklusmodulation durch Flavopiridol bei BG1-Zellen	48
Abb. 14	Zellzyklusmodulation durch Bortezomib bei SKOV-3-Zellen	49
Abb. 15	Zellzyklusmodulation durch Bortezomib bei BG1-Zellen	50
Abb. 16	Zellzyklusmodulation durch MG-115 bei SKOV-3-Zellen	50
Abb. 17	Zellzyklusmodulation durch MG-115 bei BG1-Zellen	51
Abb. 18	Zellzyklusmodulation durch Carboplatin bei SKOV-3-Zellen	52
Abb. 19	Zellzyklusmodulation durch Carboplatin bei BG1-Zellen	53
Abb. 20	direkter Vergleich der Zellzyklusmodulation durch 1 μ mol Flavopiridol bei SKOV-3- und BG1-Zellen	54
Abb. 21	Zellzyklusanalyse der SKOV-3-Zellen nach Inkubation mit Bortezomib	55
Abb. 22	Zellzyklusanalyse der BG1-Zellen nach Inkubation mit Flavopiridol und Zugabe von Carboplatin	56
Abb. 23	Zellzyklusanalyse der SKOV-3-Zellen nach Inkubation mit Bortezomib und Zugabe von Carboplatin	57
Abb. 24	Annexin-V-Assay beider Zelllinien, unbehandelte Kontrollen im Vergleich	58
Abb. 25	Annexin-V-Assay beider Zelllinien im Vergleich nach Inkubation mit 1 μ mol Flavopiridol	59
Abb. 26	Annexin-V-Assay beider Zelllinien im Vergleich nach Inkubation mit 0,1 μ mol Bortezomib	61
Abb. 27	Auswertung Annexin-V-Assay beider Zelllinien im Vergleich nach Inkubation mit 1 μ mol MG-115	62

8 Anhang

Abb. 28	Auswertung Annexin-V-Assay der BG1-Zellen nach Inkubation mit 1µmol Flavopiridol und Zugabe von 25µmol Carboplatin	63
Abb. 29	Änderung der Zellvitalität der BG1-Zelllinie	65
Abb. 30	Western Blot-Analyse Caspasen 8	66
Abb. 31	Western Blot-Analyse Caspasen 8, Kombinationsversuche	67
Abb. 32	Western Blot-Analyse Caspasen 3	68
Abb. 33	Western Blot-Analyse Caspasen 3, Kombinationsversuche	69
Abb. 34	Western Blot-Analyse Cytochrom C bei SKOV-3-Zellen	69
Abb. 35	Western Blot-Analyse Cytochrom C bei BG1-Zellen	70
Abb. 36	relative Änderung der NfκB-Aktivität der SKOV-3-Zelllinie	71
Abb. 37	relative Änderung der NfκB-Aktivität der BG1-Zelllinie	72

8.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Pipettierschema der Kombinationsversuche zur Zellzyklusanalyse	34
Tab. 2 Pipettierschema der SKOV-3-Zelllinie zur Herstellung von Gesamtzelllysaten	38
Tab. 3 Pipettierschema der BG1-Zelllinie zur Herstellung von Gesamtzelllysaten	38
Tab. 4 Pipettierschema zur Mitochondrienisolation	39
Tab. 5 Pipettierschema Primärantikörper Western Blot	42
Tab. 6 Pipettierschema der Kombinationsversuch zur Analyse der NFκB-Aktivität	43

8.5 Erklärung an Eides Statt

Ich, Julia Kranz geb. Hergarten, erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin in Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertationsschrift mit dem Titel „Effekte von Flavopiridol, Bortezomib und MG-115 in Kombination mit Carboplatin auf Ovarialkarzinom-Zelllinien in vitro“ im Zellkulturlabor der Frauenklinik unter Leitung von Herrn Prof. Dr. U. Wagner mit Unterstützung durch Herrn Dr. K. Baumann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Radolfzell, im August 2014

Julia Kranz

8.6 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren der Universitäten Marburg, Barcelona (Spanien) und Bangalore (Indien):

Abraham, Adolph, Aigner, Albert, Al Kadah, Alpmann, Alter, Aumüller, Bahr, Bals, Barth, Barth, Bartsch, Basler, Bastians, Bauer, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Behr, Benes, Berger, Besedovsky, Bette, Bien, Bock, Boeckhoff, Bolm, Braun, Brehm, Breit, Büch, Buchholz, Burbelko, Burchert, Busch, Cetin, Christiansen, Chubanov, Coll-Vinent i Puig, Cuchi, Czubayko, Daut, Del Rey, Dietrich, Dinges, Dominguez, Donner-Banzhoff, Duda, Ebel, Eberhart, Eilers, Ellenrieder, Elsässer, Engenhart- Cabillic, Feiber, Fensterer, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Funck, Garten, Geks, Gerdes, Gomez, Görg, Graf, Gress, Grimm, Groß, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Hadij, Hamer, Hasilik, Hassan, Hegele, Hellmeyer, Hellwig, Helwig- Rolig, Hermann- Lingen, Hertl, Herzum, Höffken, Hörle, Hoffmann, Hofmann, Hofstaetter, Hoyer, Iwinska- Zelder, Jacke, Jackowski-Dohrmann, Jacob, Jaques, Kalder, Kalinowski, Kann, Kanngiesser, Käuser, Kerwat, Kill, Kilpadi, Kim-Berger, Klaus, Klenk, Kingmüller, Koch, Klose, Köhler, Köhler, König, Köster, Koolmann, Krebber, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Krones, Kühnert, Kuhlmann, Kwee, Langer, Lemke, Leonhardt, Likoyiannis, Lill, Liß, Löffler, Loff, Lohoff, Lüers, Lukasewitz, Maier, Maier, Maisch, Maisner, Malek, Mandrek, Mann, Martin, Martinovic, Mederos Y Schnitzler, Marti, Mennel, Merte, Michl, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Müller, Mühlberger, Mutters, Nachtigall, Navarro Gonzalez, Neubauer, Oertel, Olbert, Pagenstecher, Pfützner, Phadke, Pieper, Plant, Pressel, Printz, Quante, Ramaswany, Rausch, Reichel, Renz, Richter, Riera-Knorrenschild, Rohlf, Röh, Rolfes, Rominger, Röper, Rose, Rosenow, Rothmund, Rybinski, Sander, Sattler, Schäfer, Schäfer, Schäfer, Schlosser, Schmidt, Schmidt, Schmitt, Schmitz, Schnabel, Schneider, Schierl, Schofer, Schrader, Schulze, Schultz, Seitz, Sesterhenn, Shiratori, Skrzypek, Skwara, Soto, Steinkamp, Steiniger, Stiletto, Stiller, Straßmann, Stempel, Sure, Suske, Tebbe, Teymoortash, Thomas, Tolosa, Torossian, Vallikad, Varga, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Waldegger, Walthers, Weihe, Werner, Westermann, Wiegandt, Wilhelm, Wollmer, Wündisch, Wulf, Zemelin, Zettl, Zwioerek

